

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

**MODELO *IN VITRO* DE PARKINSONISMO  
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR ROTENONA:  
INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO,  
NEUROPROTEÇÃO E MORTE CELULAR**

BELÉM

2011

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

**MODELO *IN VITRO* DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR  
ROTENONA: INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO,  
NEUROPROTEÇÃO E MORTE CELULAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração de Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências).

Orientadora: Prof. Dra. Elizabeth Sumi Yamada.

Co-Orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa.

BELÉM

2011

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

**MODELO *IN VITRO* DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR  
ROTENONA: INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO,  
NEUROPROTEÇÃO E MORTE CELULAR**

Tese de Doutorado submetida à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências), pelo Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Co-Orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca examinadora: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva  
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 29 de dezembro de 2011

Aos meus pais e meus avós, que sempre serão os mais importantes responsáveis por todas as minhas conquistas, e por todos os valores em que, hoje, acredito.

## AGRADECIMENTOS

Meus muitos agradecimentos a minha mãe, Leina de Nasaré Travassos da Rosa Costa, **em especial**, que sempre incentivou minha carreira e me ajudou como nunca (ou como sempre?) em mais este passo da vida.

Ao meu pai, Arnaldo Jorge Martins, por estar sempre em meu lado, dando-me toda força e incentivo que precisei.

Aos meus avós, José Jorge da Costa (*in memoriam*) e Terezinha Travassos da Rosa Costa, por terem me passado boa parte dos valores em que, hoje, acredito.

A meu padrasto, Paulo César Lopes Sousa, e minha madrasta, Carmela Matos Martins, pelas ótimas pessoas que são, e por nunca terem se negado a ajudar nos momentos que precisei.

Ao meu coorientador e amigo, Edmar Tavares da Costa, sempre disponível a me orientar, ajudar e aconselhar da melhor forma possível.

A minha orientadora, Elizabeth Sumi Yamada, a quem admiro por ser uma das grandes pessoas responsáveis pelo rumo que dei a minha carreira.

A professora Dulcidéia da Conceição Palheta, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na minha vida acadêmica.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental - LaNEx, por todos os momentos, difíceis e agradáveis, que passamos juntos.

A todos os amigos (muitos) que tenho, que muito me ajudaram a aliviar o estresse dos dias intensos de trabalho a frente do computador, e que muitas vezes me ajudaram em momentos difíceis que passei.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	Ix
	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
	<b>RESUMO</b> .....	xi
	<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1.	DOENÇA DE PARKINSON .....	1
1.1.1.	<b>Terminologia</b> .....	1
1.1.2.	<b>Epidemiologia</b> .....	2
1.1.3.	<b>Características clínicas</b> .....	3
1.1.4.	<b>Critérios para diagnóstico</b> .....	7
1.1.5.	<b>Etiologia</b> .....	7
1.1.6.	<b>Patogênese</b> .....	8
1.1.7.	<b>Os mecanismos de neurodegeneração dopaminérgica</b> .....	12
1.1.8.	<b>Tratamento</b> .....	17
1.2.	MODELOS EXPERIMENTAIS NA DOENÇA DE PARKINSON .....	17
1.2.1.	<b>Modelos <i>in vivo</i> da doença de Parkinson</b> .....	17
1.2.1.1.	6-Hidroxidopamina .....	20
1.2.1.2.	MPTP .....	20
1.2.1.3.	Rotenona .....	25
1.2.1.4.	Paraquat .....	28
1.2.1.5.	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i> .....	31
1.2.1.6.	<i>Drosophila</i> .....	32
1.2.1.7.	Camundongos transgênicos .....	33
1.2.2.	<b>Modelos <i>in vitro</i> da doença de Parkinson</b> .....	34
1.3.	O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO (Ca <sup>2+</sup> ) NA NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA .....	37
1.4.	ESTRESSE OXIDATIVO E AGENTES ANTIOXIDANTES .....	41
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	44

2.1.	OBJETIVO GERAL .....	44
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
3.1.	ANIMAIS .....	45
3.2.	CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS .....	45
3.3.	CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE ESTRIADO E MESENCÉFALO VENTRAL .....	47
3.4.	IMUNOCITOQUÍMICA .....	47
3.5.	INTOXICAÇÃO COM ROTENONA .....	49
3.6.	O PAPEL DOS ÍONS $Ca^{2+}$ NA TOXICIDADE DA ROTENONA ..... EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS E CULTURAS ORGANOTÍPICAS AO EXTRATO AQUOSO DERIVADOS DE FOLHAS DE MOGNO ( <i>Swietenia macrophylla</i> ) .....	50
3.7.	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR (MTT) .....	51
3.8.	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR (LDH) .....	52
3.10.	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE NITRITO NO SOBRENADANTE DE CULTURAS EXPOSTAS À ROTENONA .....	53
3.11.	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE NECROSE E APOPTOSE (WESTERN BLOT) EM CULTURAS EXPOSTAS À ROTENONA .....	54
3.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
4.1.	COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL .....	57
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAIIS PRIMÁRIAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL .....	62
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAIIS PRIMÁRIAS .....	65
4.4.	O ENVOLVIMENTO DOS ÍONS CÁLCIO NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA .....	68
4.5.	EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO <i>Swietenia macrophylla</i> SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR	81

	ROTENONA .....	
4.6.	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CULTURAS PRIMÁRIAS MESENCEFÁLICAS EXPOSTAS À ROTENONA.....	88
4.7.	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR NO MODELO <i>IN VITRO</i> DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA .....	94
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>97</b>
5.1.	COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS .....	97
5.2.	PADRONIZAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIS .....	101
5.3.	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À ROTENONA NA VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIS DERIVADAS DE MESENCEFALO VENTRAL .....	104
5.4.	VIAS DEPENDENTES DE ÍONS $Ca^{2+}$ NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA .....	105
5.5.	EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO <i>Swietenia macrophyla</i> SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA .....	111
5.6.	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CULTURAS PRIMÁRIAS MESENCEFÁLICAS EXPOSTAS À ROTENONA .....	113
5.7.	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR NO MODELO <i>IN VITRO</i> DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA .....	114
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>118</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da via nigroestriatal normal .....	11
Figura 2	Representação esquemática do metabolismo do MPTP .....	24
Figura 3	Representação esquemática das vias intracelulares do MPP <sup>+</sup> .....	24
Figura 4	Similaridade estrutural entre os compostos MPP <sup>+</sup> e paraquat .....	30
Figura 5	Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de mesencéfalo e hipocampo .....	59
Figura 6	Figura representativa do padrão de marcação imunocitoquímica de culturas e contra-coloração pelo método de Nissl .....	60
Figura 7	Figura representativa do padrão de marcação de culturas por imunofluorescência e com o marcador nuclear DAPI .....	61
Figura 8	Viabilidade celular de culturas expostas à rotenona .....	64
Figura 9	Viabilidade celular de culturas expostas à rotenona por diferentes períodos de tempo .....	67
Figura 10	Participação do Ca <sup>2+</sup> microsomal na degeneração celular induzida por rotenona .....	72
Figura 11	Participação do trocador 2Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> na degeneração celular induzida por rotenona .....	74
Figura 12	Participação do Ca <sup>2+</sup> extracelular na degeneração celular induzida por rotenona .....	76
Figura 13	Participação de canais de Ca <sup>2+</sup> dependentes de voltagem tipo L na degeneração celular induzida por rotenona .....	78
Figura 14	Participação do Ca <sup>2+</sup> mitocondrial na degeneração celular induzida por rotenona .....	80
Figura 15	Padronização da curva de toxicidade do extrato aquoso de folhas de mogno .....	84
Figura 16	Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona .....	87
Figura 17	Análise da produção de nitrito induzido por rotenona em culturas mesencefálicas .....	90
Figura 18	Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a produção de nitrito em culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona .....	93

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática	6
Tabela 2	Principais modelos experimentais de DP e suas características .....	19
Tabela 3	Caracterização imunocitoquímica de culturas neuronais derivadas de hipocampo e mesencéfalo ventral .....	58
Tabela 4	Viabilidade celular de culturas expostas à rotenona .....	63
Tabela 5	Efeitos neurotóxicos induzidos por rotenona em diferentes períodos de exposição .....	66
Tabela 6	Efeito da Tapsigargina sobre a viabilidade celular de culturas expostas à rotenona .....	71
Tabela 7	Efeito do Benzamil sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas .....	73
Tabela 8	Efeito do EDTA sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas .....	75
Tabela 9	Efeito da Nifedipina sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas .....	77
Tabela 10	Efeito do Vermelho de Rutênio sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas .....	79
Tabela 11	Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas (método do MTT) .....	83
Tabela 12	Efeito do Extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas expostas á rotenona (método do LDH) .....	86
Tabela 13	Análise da produção de nitrito e da viabilidade celular sobre culturas mesencefálicas mistas expostas á rotenona e extrato de mogno .....	89
Tabela 14	Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a produção de nitrito em culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona .....	92
Tabela 15	Análise da expressão das proteínas espectrina, calpaína e caspase de culturas primárias mistas mesencefálicas .....	96

## RESUMO

Evidências crescentes na literatura têm sugerido papel importante para os fatores ambientais, como a exposição a pesticidas, na patogênese da doença de Parkinson. Em animais experimentais, a exposição à rotenona, um pesticida e piscicida de uso comum, induz características de parkinsonismo através da inibição do complexo I mitocondrial. O objetivo deste estudo foi investigar a morte de neurônios induzida por rotenona utilizando culturas primárias mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral de ratos, bem como o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  na neste modelo experimental e a utilização de extrato aquoso de folhas de mogno com substâncias com alto poder antioxidante. A perda neuronal foi analisada com ensaios colorimétricos (MTT e LDH). Nossos resultados mostraram significativa redução na viabilidade celular após exposição à rotenona de maneira dependente de concentração, mas não dependente de tempo. Foi observada igual e elevada suscetibilidade em culturas mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral ao agente neurotóxico. Em termos mecanicísticos, nossos resultados mostraram um papel discreto desempenhado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial na neurodegeneração induzida por rotenona. Além disso, neste paradigma utilizado, verificamos que o extrato aquoso de folhas de mogno não promoveu proteção contra a toxicidade da rotenona, na concentração testada; ainda, promoveu efeito sinérgico em associação com rotenona. Verificou-se ainda que a rotenona, bem como o extrato de mogno promoveu indução de morte celular tanto por necrose quanto por apoptose, nas concentrações utilizadas. Os resultados deste estudo devem avançar nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação de fatores ambientais na patogênese da doença de Parkinson.

## ABSTRACT

Increasing evidence has suggested a role for environmental factors, such as exposure to pesticides, in the pathogenesis of Parkinson's disease. In experimental animals the exposure to rotenone, a common herbicide and piscicide, induces features of parkinsonism by inhibiting the activity of mitochondrial complex I. Here we propose to investigate rotenone-induced death of neurons by using primary neuron-enriched and neuron-glia cultures from the rat hippocampus and ventral mesencephalon. The neuronal loss was evaluated with the colorimetric MTT assay. Our results showed significant reduction in the cell viability after exposure to rotenone in a dose- but not in a time-dependent manner. We also discovered a remarkable feature of rotenone-induced degeneration of cultured neurons. The higher susceptibility was observed in neuron-glia cultures from the ventral mesencephalon, suggesting that the presence of glia, especially microglia, is an important factor contributing to neurodegeneration. Also, as showed by immunohistochemistry, this type of culture presented the higher density of tirosina-hidroxilase (TH)-positive neurons. Mechanistically, our results with calcium blockers showed a minimal role played by external calcium, and an important synergistic influence of the ions from the internal stores in the rotenone-induced neurodegeneration. Indeed, in this study, we report that aqueous extract of mahogany leaves didn't protect against the rotenone-induced toxicity, in the used concentration; and promoted a synergistic effect when associated with rotenona. Finally, the mahogany leaves extract induced celular death both necrosis and apoptosis. The results of this study should advance our understanding of the mechanism of action for environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. A DOENÇA DE PARKINSON**

#### **1.1.1. Terminologia**

O termo parkinsonismo representa um conjunto de sintomas típicos da doença de Parkinson (DP), que incluem: rigidez muscular (resistência aumentada a movimentos passivos), tremor em repouso, bradicinesia (lentidão de movimentos) e instabilidade postural (equilíbrio e coordenação prejudicados). A doença de Parkinson, o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum relacionado à idade depois da doença de Alzheimer, foi primeiramente descrita por James Parkinson em 1817, através de sua famosa monografia “*An essay on the shaking palsy*” (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

Os achados patológicos mostram que há uma perda acentuada de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNpc) e o aparecimento de inclusões citoplasmáticas fibrilares, conhecidas como corpos de Lewy, nos neurônios remanescentes. Assim, para se obter um diagnóstico definitivo da *DP idiopática* faz-se necessária a autópsia (Samii *et al.*, 2004).

A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados e não possuem causa conhecida; a DP familiar e o parkinsonismo familiar são termos usados para descrever entidades relacionadas a padrões tanto autossômicos dominantes como recessivos (Samii *et al.*, 2004). O termo Parkinsonismo “plus” refere-se a síndromes parkinsonianas desenvolvidas em decorrência de outras doenças, tais como

demência com corpos de Lewy, atrofia sistêmica múltipla, paralisia supranuclear progressiva e degeneração corticobasal (Samii *et al.*, 2004).

### **1.1.2. Epidemiologia**

A prevalência da DP em países industrializados está estimada em 0,3% da população geral e em aproximadamente 1% da população com idade acima de 60 anos, afetando mais de um milhão de pessoas na América do Norte (Samii *et al.*, 2004). A incidência desta doença aumenta consideravelmente com a idade, de 20/100.000 aos 55 anos até 120/100.000 aos 70 anos de idade. Pessoas de todas as origens étnicas podem ser afetadas, e os homens são ligeiramente mais predispostos a desenvolver este distúrbio (ver abaixo). Em pessoas com DP com início precoce, os sintomas iniciais aparecem por volta de 21 a 30 anos de idade e compreende cerca de 0,5 a 1 % dos casos de DP, enquanto que os casos de início juvenil podem se iniciar antes dos vinte anos de idade (Beal, 2001). Em aproximadamente 95 % dos casos não há aparentemente nenhuma ligação genética (DP idiopática) (Dauer & Przedborski, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da DP é maior em homens do que em mulheres, apesar de encontrarmos valores díspares para as taxas relativas entre os dois gêneros. Por exemplo, em uma revisão feita por Shulman (2002), o autor sustenta que a DP é mais prevalente em homens a uma taxa relativa aproximada de 3:2. Em outro desses estudos, o autor demonstrou que a incidência da doença de Parkinson aumenta com a idade tanto em homens quanto em mulheres, mas a incidência no homem excede em até duas vezes a observada nas mulheres (Mayeux, 2003). No entanto, estudos mostraram que a prevalência é maior em homens em uma taxa relativa variável de 1,36

(Bauer *et al.*, 1982 apud Sawada *et al.*, 2000) a 3,7 (Li *et al.*, 1985 apud Sawada *et al.*, 1985).

### **1.1.3. Características clínicas**

A doença de Parkinson costuma ser caracterizada, desde o início do século XIX, como uma combinação de tremor, rigidez e lentidão ou pobreza de movimentos — esta última característica quase sempre confundida com fraqueza, como exemplificado pelo primeiro termo a denominar esta condição: ‘Paralisia Agitante’. À medida que as observações clínicas foram sendo aperfeiçoadas, tornou-se cada vez mais difícil trabalhar com uma simples definição clínica de DP, muito em função de que combinações semelhantes de sinais e sintomas, começaram a ser reconhecidas como uma consequência de certas infecções (encefalite letárgica), drogas, intoxicações (neurotoxina MPTP – ver adiante), trauma (encefalopatia do pugilato) e outras desordens neurodegenerativas (e.g., paralisia supranuclear progressiva) (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

No decorrer do século XX, o desenvolvimento da patologia microscópica incorporou novos achados morfológicos, capazes de melhorar a classificação da doença. Assim, no caso da DP, tornou-se uma condição imprescindível para o diagnóstico *post-mortem* de todos os casos verdadeiros da doença a presença, nos neurônios remanescentes da substância negra, de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas arredondadas, com um halo claro, denominadas corpos de Lewy, primeiramente descritos por Fredrich Lewy.

Ao final do século XX, no entanto, esta base sólida para o diagnóstico começou a mostrar deficiências, de vez que em 1991, Rajput e colaboradores descreveram casos de pacientes que apresentavam todas as características clínicas da DP, mas com emaranhados

neurofibrilares nos neurônios da substância negra, ao invés dos corpos de Lewy. Adicionalmente, foram relatados casos de diagnóstico de corpos de Lewy no encéfalo de indivíduos neurologicamente normais e em diversas outras desordens neurodegenerativas que não poderiam ser confundidas com a DP – como é o caso da doença de Hallervorden–Spatz e a pan-encefalite esclerosante subaguda (Calne, 2004).

Mesmo com todas as controvérsias, algumas destacadas nos parágrafos anteriores, destacam-se os seguintes critérios de inclusão para o diagnóstico da doença: presença dos sinais clássicos de tremor em repouso, rigidez muscular e bradicinesia, com instabilidade postural. A instabilidade postural, por vezes, é considerada como característica cardinal, mas não é específica e geralmente está ausente no início da doença. O tremor em repouso é o principal sintoma em cerca de 70% dos pacientes, diminuindo em atos de movimento voluntário. A rigidez é destacada por uma resistência no movimento das articulações. E a bradicinesia normalmente é o primeiro sintoma no início da DP, caracterizada por uma lentidão dos movimentos. O início da doença é lento e os déficits são geralmente assimétricos. Há progressão inexorável da doença, assim como resposta mantida a drogas dopaminérgicas (desde que tolerados em doses normais). Os corpos de Lewy são achados comuns na SNpc. A perda neuronal é também predominante nesta região, o que leva a diminuição da disponibilidade de dopamina no estriado, com um gradiente rostrocaudal (perda maior na porção caudal). Outros sinais motores também podem ser observados em alguns pacientes, tais como: hipocinesia (redução na amplitude de movimentos), acinesia (ausência de movimentos inconscientes), hipomimia (diminuição da expressão facial normal) e hipofonia (diminuição do volume da voz) (Tabela 1) (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).



Além destas características motoras, várias outras características tipicamente não-motoras são observadas, incluindo disfunções autonômicas e cognitivas, mudanças psiquiátricas, sintomas sensoriais e distúrbios no sono (Tabela 1) (Samii *et al.*, 2004).

**Tabela 1:** Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática

<b>Sinais motores clássicos</b>	<b>Sinais motores secundários</b>	<b>Sinais não-motores</b>
Tremor em repouso	Hipocinesia	Depressão
Rigidez muscular	Acinesia	Distúrbios no sono
Bradicinesia	Hipomimia	Demência (mais frequente em pacientes idosos)
Instabilidade postural	Hipofonia	Lentidão de processos cognitivos
	Micrografia	Disfunções autonômicas (maior frequência urinária, constipação)
		Comportamento psicótico

**Fonte:** Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004.

#### **1.1.4. Critérios para diagnóstico**

Um diagnóstico definitivo para DP necessita de autópsia, com identificação de perda neuronal dopaminérgica e formação de corpos de Lewy no citosol de neurônios dopaminérgicos remanescentes. Em vida, a DP normalmente é diagnosticada clinicamente, não sendo necessários testes de laboratório ou técnicas de neuroimagem. Devido a isso, o diagnóstico clínico para esta doença tem se tornado mais rigoroso, com graduações na sua certeza, com a inclusão de diversas escalas, como por exemplo: clinicamente possível, clinicamente provável e clinicamente definitivo; o diagnóstico é considerado clinicamente definitivo após avaliação da resposta ao tratamento com drogas dopaminérgicas (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

#### **1.1.5. Etiologia**

A causa para DP esporádica ainda é desconhecida. Considera-se atualmente que a DP seja resultado de múltiplos fatores, incluindo envelhecimento natural, susceptibilidade genética e exposição a fatores ambientais (Samii *et al.*, 2004; Shimohama *et al.*, 2003). Embora a incidência deste distúrbio se eleve com a idade, normalmente não se aceita que a causa seja apenas um reflexo do processo de envelhecimento natural (Samii *et al.*, 2004).

Além disso, apesar da maior parte das pessoas com DP não apresentarem história familiar, vários *loci* gênicos autossômicos, dominantes ou recessivos, já foram identificados. Assim, já foram descritas mutações nos genes que codificam as proteínas  $\alpha$ -sinucleína e hidrolase L1 carboxi-terminal da ubiquitina em casos familiares de DP autossômica dominante (Polymeropoulos, 1997; Shimohama *et al.*, 2003), enquanto que

algumas mutações no gene da parquina, PARK2, estão envolvidas com o desenvolvimento de DP autossômica recessiva de início juvenil (Kitada, 1998).

Outro componente importante na etiologia da doença está representado por fatores ambientais, tais como a exposição a pesticidas, o ambiente rural e o consumo de água não potável, o que aumenta consideravelmente a predisposição da pessoa a desenvolver uma síndrome parkinsoniana (Samii *et al.*, 2004). Um risco ambiental adicional para a DP é a exposição ocupacional a metais pesados, entre os quais podemos destacar o manganês, o alumínio e o ferro (Sherer *et al.*, 2002). A exposição ocupacional ao manganês está envolvida no aumento da predisposição ao desenvolvimento de uma síndrome parkinsoniana (Tanner, 1992). O alumínio possui propriedades neurotóxicas, atuando na inibição da via glicolítica no sistema nervoso central (SNC), no bloqueio do metabolismo de ácidos nucléicos e na interferência com o magnésio na regulação de receptores de neurotransmissores (Lai & Blass, 1984). O ferro é um dos mais importantes elementos do corpo, porém sua deficiência e seu excesso estão envolvidos na patofisiologia de diferentes desordens no SNC. Seu acúmulo no SNC tem sido envolvida no desenvolvimento de diversos distúrbios neurológicos, entre eles o mal de Alzheimer e a doença de Parkinson (Sadrzadeh e Saffari, 2004).

#### **1.1.6. Patogênese**

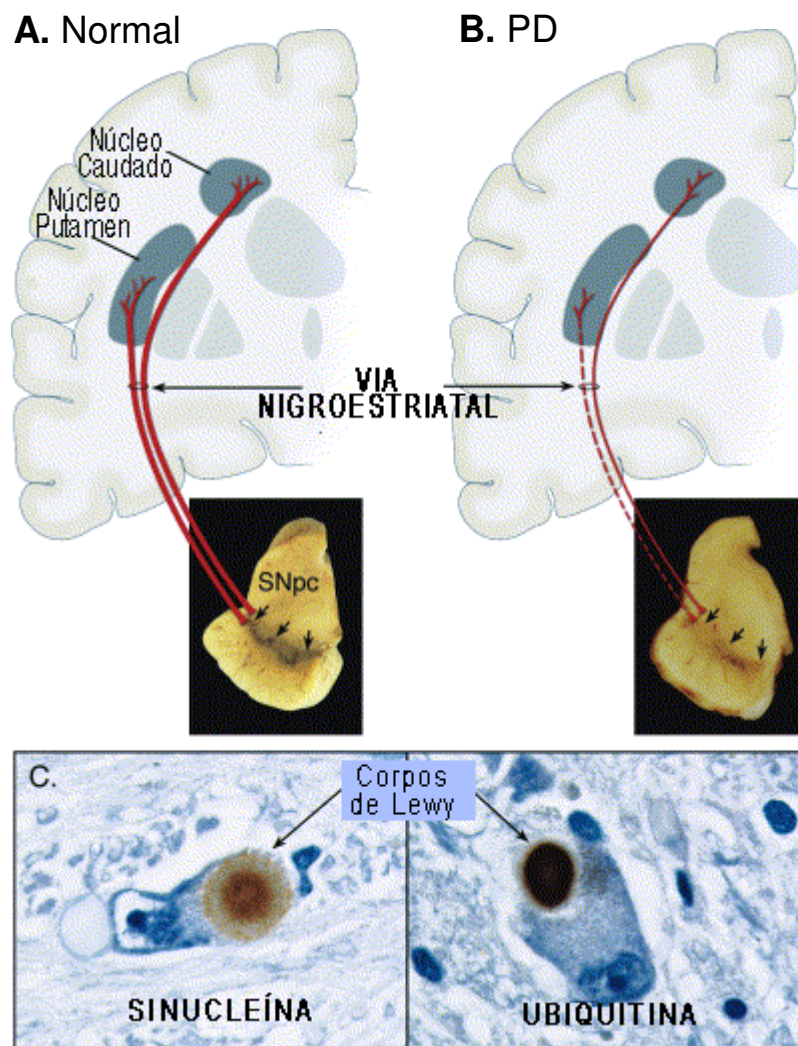
O achado patológico característico na DP é uma diminuição nas projeções da SNpc para os núcleos caudado e putamen (neostriado), devido à morte acentuada da população de neurônios dopaminérgicos daquele núcleo (Figura 1). Inclusões fibrilares no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos remanescentes, conhecidas como corpos de

Lewy, são as marcas citopatológicas da doença. Os sinais clínicos tornam-se evidentes quando cerca de 80% da dopamina estriatal e cerca de 60% da população de neurônios dopaminérgicos são perdidos. Os corpos de Lewy não estão confinados na substância negra e podem ser vistos em outras regiões, assim como em patologias diversas, tanto no SNC (e.g., córtex, amígdala, *locus coeruleus*, núcleo vagal) quanto no sistema nervoso periférico (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

Estudos patológicos relacionados à neurodegeneração na DP sugerem um conjunto de achados característicos. Primeiro, a perda de neurônios dopaminérgicos associada à DP tem uma característica topológica distinta do padrão visto no envelhecimento normal. Na DP, a perda celular está concentrada nas porções caudal e ventrolateral da SNpc, enquanto que durante o envelhecimento normal, a porção dorsomedial da substância negra (SN) é a região mais afetada. Segundo, o grau da perda de terminais neuronais no estriado é maior do que a perda de neurônios na SN. Terceiro, o mecanismo fisiológico de remoção da dopamina parece ser mais dependente de seu transportador no estriado do que no córtex pré-frontal, onde outros transportadores monoaminérgicos e a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) desempenham um papel maior no término das ações da dopamina (Dauer & Przedborski, 2003). Adicionalmente, observa-se no estriado uma drástica redução nos níveis de dopamina, seus metabólitos - ácidos homovanílico e 3,4-dihidroxifenilacético - e receptores (Shimohama *et al.*, 2003).

Embora a marca patológica da DP seja a perda de neurônios dopaminérgicos, este processo degenerativo se estende para outras populações neuronais. A neurodegeneração e a formação de corpos de Lewy são também observadas nos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico (*locus coeruleus*), serotoninérgico (núcleo da rafe) e

colinérgico (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do nervo vago), assim como no córtex cerebral (especialmente os córtices cingulado e entorrinal), bulbo olfatório e no sistema nervoso autônomo (Dauer & Przedborski, 2003). De todos esses sítios, acredita-se que a neurodegeneração observada em estruturas do hipocampo e nos *inputs* corticais colinérgicos contribuem de maneira especialmente relevante para os quadros de demência elevada, observada especialmente quando a DP se manifesta em pacientes mais idosos.



**Figura 1.** (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Os neurônios dopaminérgicos da SNpc (setas), projetam (linhas vermelhas sólidas) para o estriado (núcleos caudado e putamen). (B) Representação esquemática da mesma via afetada pela DP: degeneração (setas) e acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que projetam para o putamen (linha tracejada), com perda mais modesta dos que projetam para o caudado (linha vermelha fina). (C) Imunocitoquímica dos corpos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da SNpc confirma que os mesmos apresentam agregados de alfa-sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

### 1.1.7. Os mecanismos de neurodegeneração dopaminérgica

A neurodegeneração observada na DP pode estar relacionada a diversos fatores, que incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade, apoptose e inflamação (Samii *et al.*, 2004), não descartando, também, o possível papel da expressão de proteínas defeituosas, com a conseqüente formação de agregados protéicos intracelulares (Dauer & Przedborski, 2003).

A possibilidade de que um defeito na fosforilação oxidativa desempenhe um papel na patogênese da DP começou a ser levantada com a descoberta de anormalidades na atividade do complexo I mitocondrial em pacientes (Dauer & Przedborski, 2003). Tais anormalidades não estão confinadas ao SNC, sendo encontradas também em plaquetas de pacientes com DP idiopática (Schapira *et al.*, 1990 apud Dauer & Przedborski, 2003; Parker *et al.*, 1989 apud Dauer & przedborski, 2003).

Aproximadamente 100% do oxigênio molecular é consumido na respiração mitocondrial, sendo produzidas, como resultado deste processo, moléculas altamente oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), conhecidas espécies reativas do oxigênio (ERO). O radical superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio, então, é convertido em água sob ação das enzimas catalase e/ou glutational peroxidase (SNC), porém ele também pode reagir com íons  $Fe^{2+}$ , através da reação de Fenton, promovendo a formação de radicais hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) altamente reativos. O radical superóxido também pode reagir com o óxido nítrico (NO), formando peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). O peroxinitrito, então, pode causar danos celulares reagindo com ácidos



nucléicos, proteínas e lipídios (Stahl & Sies, 2002). A inibição do complexo I pode aumentar a produção dessas ERO, potencializando seus efeitos deletérios para as células. Um alvo para essas ERO pode ser a própria cadeia transportadora de elétrons, levando a danos mitocondriais e aumento adicional na produção de ERO, gerando um ciclo vicioso e extremamente tóxico para a célula (Dauer & Przedborski, 2003).

De acordo com isto, alguns estudos *post-mortem* demonstraram evidências tanto de danos oxidativos quanto de uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial na substância negra de pacientes com DP (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

Os neurônios dopaminérgicos podem estar em um microambiente particularmente fértil para a geração de ERO: o próprio metabolismo da dopamina produz peróxido de hidrogênio e radicais superóxido. Além disso, a própria auto-oxidação da dopamina, que leva a produção de melanina na SN, também gera subprodutos tóxicos para a célula, tais como a dopamina-quinona, uma molécula que danifica proteínas através da reação com resíduos de cisteína (Graham, 1978 *apud* Dauer & Przedborski, 2003), e peróxido de hidrogênio, que se decompõe em radicais hidroxila (Sherer *et al.*, 2002).

A presença de ERO pode aumentar a quantidade de proteínas defeituosas, elevando a demanda do sistema de proteossomo da ubiquitina. A deposição anormal de proteínas no SNC é uma característica de várias doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, e a DP não é exceção. Proteínas defeituosas, solúveis ou agregadas, podem diretamente causar danos, possivelmente pela deformação causada às células ou pela interferência no tráfico intracelular. Inclusões protéicas podem, também, sequestrar proteínas que são importantes para a sobrevivência celular. Neste aspecto, existem dois

focos em estudo na DP esporádica: um que diz respeito à disfunção de proteínas e outro ao sistema de proteossomo, que podem, ambos, contribuir indiretamente para a acumulação de proteínas defeituosas (Dauer & Przedborski, 2003).

Na DP, os corpos de Lewy contêm a proteína  $\alpha$ -sinucleína modificada por oxidação, exibindo assim, em experimentos *in vitro*, uma maior tendência à agregação (Giasson *et al.*, 2000). Vários herbicidas, como a rotenona e o paraquat, induzem defeitos e agregação de  $\alpha$ -sinucleína (Betarbet *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Manning-Bog *et al.*, 2002; Uversky *et al.*, 2001).

Outro fator importante na DP é a intensa reação glial que ocorre concomitante à degeneração de neurônios dopaminérgicos, e que geralmente é considerada como um evento não específico desta doença, pois ocorre também em outros distúrbios neurológicos, tais como na doença de Alzheimer e no infarto cerebral, bem como em modelos experimentais de DP (Gao *et al.*, 2003). Entretanto, evidências em humanos (Langston & Ballard Jr, 1983; Langston *et al.*, 1983; Langston *et al.*, 1999), assim como estudos com animais (Gao *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), têm sugerido que a inflamação pode ser um fenômeno ativo na DP, promovendo continuamente a morte celular neste processo neurodegenerativo. O que se especula é o fato de que, após uma lesão primária de origem ambiental ou genética, o processo inflamatório decorrente da reação glial possa perpetuar a degeneração de neurônios dopaminérgicos (Hartmann *et al.*, 2003).

A resposta inflamatória é a primeira linha de defesa contra lesões e infecção no SNC; entretanto, uma resposta inflamatória excessiva pode também ser uma fonte adicional de danos às células do hospedeiro. No SNC, a principal marca da inflamação é a ativação

de células gliais, particularmente a microglia. As células microgлияis, consideradas células do sistema imunológico residentes no SNC, são sensíveis aos menores distúrbios na homeostase no encéfalo e tornam-se ativadas em muitas condições neuropatológicas, como doença de Alzheimer, DP, esclerose múltipla, demência na AIDS, trauma e derrame. Com a ativação, a microglia sofre algumas mudanças em sua plasticidade funcional, transformando-se em células semelhantes aos macrófagos; tais mudanças envolvem mudanças morfológicas, proliferação, aumento na expressão de receptores de superfície e produção de fatores neurotróficos e neurotóxicos. A microglia ativada, assim, pode contribuir com danos adicionais devido a liberação desses fatores, que incluem TNF- $\alpha$ , IL-1, radicais livres (ERO e espécies reativas de nitrogênio), proteases, eicosanóides e aminoácidos excitatórios. Por outro lado, alguns aspectos da inflamação podem realmente ser benéficos contra danos no SNC; por exemplo, ao passo que se acredita que a microglia secreta fatores primariamente neurotóxicos, por outro lado a astrogлия atua como fonte primária de fatores neurotróficos, embora a microglia e a astrogлия ativadas produzam, ambas, fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias. Além disso, a microglia ativada também pode exibir um efeito neuroprotetor através da remoção de debris celulares, destruição de patógenos e liberação de fatores neurotróficos, enquanto que os astrócitos podem contribuir com a sobrevivência neuronal pela eliminação de substâncias tóxicas, liberação de neurotrofinas e promoção de reparo tecidual. Entre esses efeitos benéficos, a elevada liberação de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês *glia-derived neurotrophic factor*) é uma das principais substâncias pela qual a glia ativa exerce atividade neuroprotetora (Gao *et al.*, 2003).

Outro ponto importante no que concerne à patogênese da DP, e que ainda permanecem sob investigação, é a respeito dos mecanismos pelos quais a disfunção na atividade do complexo I mitocondrial leva à neurodegeneração dopaminérgica. Neste ponto de vista, diversas hipóteses podem ser levantadas; uma abordagem interessante foge um pouco da chamada “teoria da dopamina” e defende que a atividade reduzida do complexo I pode causar, além de danos oxidativos, o fenômeno de excitotoxicidade. Além disso, disfunções na atividade deste complexo podem levar a alterações nos níveis de ATP, ou prejudicar a homeostase dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ou ambos (Sherer *et al.*, 2002). Assim, diminuições nos níveis de ATP podem prejudicar a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, resultando em despolarização neuronal parcial por promover diminuição no gradiente de concentração dos íons  $\text{K}^+$ . Tal despolarização diminui o bloqueio dependente de voltagem promovido por íons magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) sobre o receptor glutamatérgico do tipo NMDA. Sob essas condições, desde que haja disponibilidade de glutamato na fenda, pode ocorrer excitotoxicidade mediada pela ativação desses receptores glutamatérgicos e conseqüente elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Tanto a magnitude como a duração desta elevação transitória nos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser aumentadas pela atividade reduzida da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, ou ainda pela falha na captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria. Assim, uma disfunção na atividade do complexo I pode levar a uma ativação anormal do receptor de glutamato do tipo NMDA e, ao mesmo tempo, promover maiores insultos à população de neurônios dopaminérgicos da SNpc (Sherer *et al.*, 2002).

### **1.1.8. Tratamento**

Poucas doenças neurológicas têm recebido tanta atenção e investimento em pesquisa como a doença de Parkinson. Embora tenham ocorrido avanços no que se refere ao desenvolvimento de agentes para tratamento desta desordem, nenhum destes estava endereçado ao problema subjacente e primário, representado pela progressiva perda de neurônios dopaminérgicos. As estratégias terapêuticas atuais para a doença de Parkinson têm o objetivo de reduzir a severidade dos sintomas, com o uso de quatro categorias principais de drogas: (1) anticolinérgicos, (2) agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da MAO e (4) L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA).

## **1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS NA DOENÇA DE PARKINSON**

### **1.2.1. Modelos *in vivo* da doença de Parkinson**

A fim de demonstrar relevância direta com a DP humana, um modelo animal ideal deve ter as seguintes características: (1) apresentar uma população normal de neurônios dopaminérgicos ao nascimento, em que possa ser promovida perda seletiva e gradual no início da idade adulta como resultado da manipulação experimental; (2) o modelo deve gerar déficits motores facilmente detectáveis, incluindo os sinais cardinais da DP em humanos; (3) o modelo deve mostrar o desenvolvimento de corpos de Lewy característicos na população de neurônios dopaminérgicos poupados pela experimentação; (4) se o modelo for genético, deve ser baseado em uma simples mutação que permita sua propagação normal; e, finalmente, (5) deve ter um curso de desenvolvimento relativamente

rápido, de alguns meses, permitindo avaliação rápida com menor custo terapêutico (Beal, 2001).

Os modelos animais de DP mais comumente utilizados atualmente são os seguintes (ver Tabela 2):

**Tabela 2:** Principais modelos experimentais de DP e suas características. 6-OH-DA, 6-hidroxidopamina; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; LPS, Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

<b>Modelos</b>	<b>Déficits motores</b>	<b>Corpos de Lewy</b>	<b>Tempo de curso</b>	<b>Comentários</b>
<b>6-OH-DA</b>	Sim	Não	Pequeno	Efetiva em camundongos, ratos, gatos e primatas.
<b>MPTP</b>	Sim	Não	Pequeno	Roedores são menos sensíveis.
<b>Rotenona</b>	Sim	Sim	Pequeno	Efetiva em ratos Lewis.
<b>Paraquat</b>	Sim	Sim	Pequeno	Ainda pouco se sabe se sua toxicidade é seletiva para neurônios dopaminérgicos.
<b>LPS</b>			Variável	Utilizado para estudar o papel da resposta inflamatória.
<b>Drosophila</b>	Sim	Sim	Pequeno	Resposta a agonistas de receptores dopaminérgicos não está clara.
<b>Camundongos transgênicos</b>	Sim	Sim	Longo ( $\cong$ 1 ano)	Resultados inconsistentes. Corpos de Lewy presentes no núcleo e no citoplasma.

**Fonte:** Beal, 2001; Dauer & Przedborski, 2003.

#### 1.2.1.1. 6-hidroxi-dopamina (6-OH-DA)

Este análogo da dopamina foi o primeiro agente usado como modelo de DP, há cerca de 30 anos atrás. Como a 6-OH-DA não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, este modelo baseia-se na injeção do composto diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar (comumente na SN ou no estriado), onde vai se acumular seletivamente nos neurônios dopaminérgicos, promovendo a degeneração desta população de neurônios, possivelmente pela geração de radicais livres. É uma toxina efetiva em ratos, camundongos, gatos e primatas, animais onde tem sido predominantemente usada para produzir lesões unilaterais. Não resulta na formação de corpos de Lewy na SN e pode produzir danos não específicos a outras populações de neurônios (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

Em ratos, a extensão da depleção de dopamina como resultado da administração de 6-OH-DA pode ser avaliada farmacologicamente. Devido à lesão provocada pela 6-OHDA, os animais apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos à aplicação de agonistas de receptores da DA, como a apomorfina, que resulta em rotações contralaterais. A administração de agonistas indiretos, tais como a anfetamina, que promove liberação de dopamina de neurônios no lado contralateral, produz rotações ipsilaterais (Gerlach & Riederer, 1996; Hirschhorn *et al.*, 1983). Esta é a principal vantagem deste modelo, a indução de déficits motores quantificáveis (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.2. MPTP

Enquanto que o achado neuropatológico característico da DP idiopática, a morte de neurônios da substância negra, é conhecido há mais de 60 anos, ainda hoje não se



conhecem as causas para que esta degeneração ocorra. Parte dessa resposta pode derivar de pesquisas realizadas com uma neurotoxina conhecida como MPTP. Este composto tem se mostrado seletivamente tóxico para os neurônios da substância negra, e capaz de originar nos animais a maioria dos sinais e sintomas da DP idiopática.

O MPTP foi primeiramente investigado em função de seu possível uso terapêutico em 1947, mas os animais (primatas) aos quais a droga foi administrada desenvolveram rigidez e ficaram incapazes de se mover, eventualmente chegando ao óbito.

Décadas mais tarde, em 1976, ocorreu o primeiro caso de parkinsonismo causado por MPTP, quando um estudante universitário americano que tentava produzir para consumo próprio o MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina), um composto narcótico ilícito, considerado à época um tipo de heroína sintética, cometeu um erro e produziu o MPTP. Dentro de três dias, este indivíduo desenvolveu parkinsonismo grave. Dois anos depois, cometeu suicídio e a autópsia revelou perda neuronal acentuada na substância negra, em um padrão de lesão muito semelhante ao observado em pacientes com DP (Langston *et al.*, 1984).

Em 1982, o MPPP foi novamente manufaturado e vendido nas ruas como heroína sintética. Lotes contaminados com MPTP também chegaram às ruas, causando efeitos devastadores em usuários jovens (Langston *et al.*, 1983). Logo se descobriu que este dano permanente aos neurônios da substância negra era causado pelo MPTP, que se tornava a primeira droga conhecida a causar a DP idiopática. Desde então o MPTP tem sido usado em modelos experimentais de DP (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

O aspecto mais fascinante da descoberta do MPTP é o de ter demonstrado para a comunidade científica a possibilidade de uma causa ambiental para a doença. Além disso,

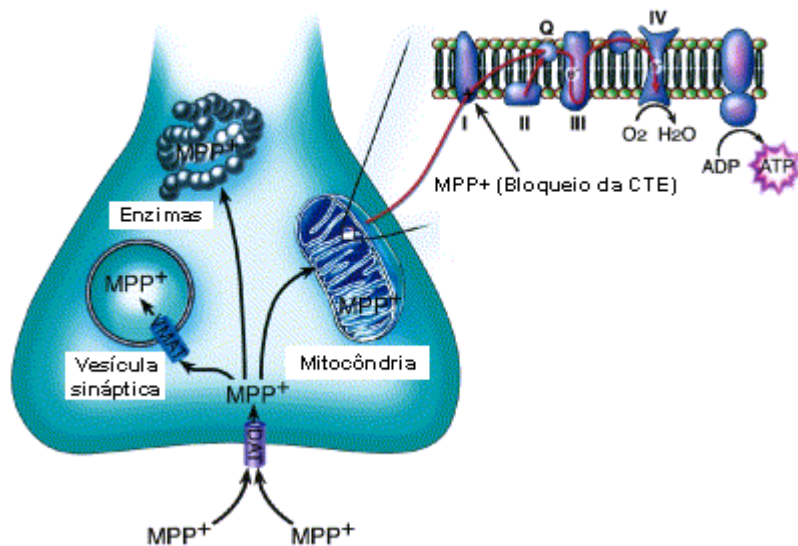
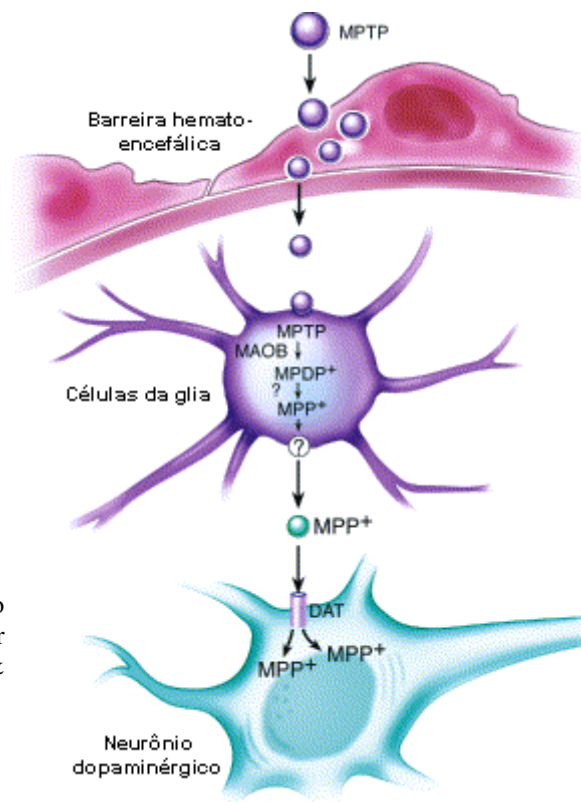
os achados iniciais relacionando o MPTP com a DP adicionaram outra dimensão ao estudo da doença, pois embora o MPTP não seja a causa da DP idiopática, sugere uma base química para a doença que, eventualmente, poderá levar a descobertas posteriores nesta área e à possibilidade de uma cura química.

O MPTP é altamente lipofílico e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. No SNC ele é convertido no seu metabólito ativo, 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP<sup>+</sup>), dentro de células da glia, pela enzima monoamina oxidase-B (MAO-B), envolvida na degradação de catecolaminas. Em seguida, o MPP<sup>+</sup> é lançado para o meio extracelular de onde será captado por transportadores de dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporters*) da membrana plasmática dos neurônios, com os quais tem alta afinidade, acumulando-se, assim, no interior de neurônios dopaminérgicos (Figura 2). Dentro dos neurônios o MPTP pode percorrer três vias: (1) pode ser captado por transportadores vesiculares de monoaminas e armazenado dentro de sinaptossomos, (2) pode permanecer no citosol e interagir com enzimas citoplasmáticas, ou (3) pode ser captado e concentrado dentro de mitocôndrias, onde irá inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Figura 3). Esta última via pode provocar redução na geração de ATP, além do aumento na produção de radicais livres, extremamente danosos para a célula, induzindo morte celular por apoptose.

Além do dano supramencionado, outros dois tipos de disfunções celulares têm sido focalizados na patogênese da DP experimental induzida por MPTP: o estresse oxidativo e a agregação anormal de proteínas (Dauer & Przedborski, 2003). Experimentos *in vitro* em mitocôndrias isoladas de cérebro inteiro demonstram que a atividade do complexo I pode ser inibida em até 70% (Davey & Clark, 1996), mas dados de tecidos

*post-mortem* mostram uma inibição de apenas 40% nesta atividade (Schapira *et al.*, 1990 *apud* Dauer & Przedborski, 2003). Em um raro estudo retrospectivo em humanos, análises neuropatológicas de três pacientes expostos ao MPTP por um período de 3-16 anos mostraram vestígios de microglia ativada circundando e promovendo morte celular (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

**Figura 2:** Representação esquemática do metabolismo do MPTP. DAT, transportador de dopamina. Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).



**Figura 3:** Representação esquemática das vias intracelulares do MPP<sup>+</sup>. CTE, cadeia transportadora de elétrons; DAT, transportador de dopamina; VMAT, transportador vesicular de monoaminas. Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

A toxicidade do MPTP em primatas é capaz de replicar todos os sinais clínicos da DP, incluindo tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. Esta toxina também causa perda de neurônios no *locus coeruleus*, um núcleo que também sofre neurodegeneração na DP. Outro fator importante deste modelo é a boa resposta apresentada ao tratamento com L-DOPA (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

A principal dificuldade com o modelo de DP induzido por MPTP é que o modo de administração da droga é agudo ou subagudo, enquanto que a DP é um processo progressivo lento que envolve vários anos (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

#### 1.2.1.3. Rotenona

A rotenona é o mais potente composto da família dos rotenóides. É um composto lipofílico, de ocorrência natural no ambiente, que pode ser extraído de raízes de certas espécies de plantas para ser utilizado como pesticida ou para pesca por certas populações ribeirinhas. Atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e atua como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Possui certa notabilidade porque, apesar de agir uniformemente por todo SNC, pode produzir degeneração seletiva de neurônios nigroestriatais quando administrada de maneira crônica (Beal, 2001; Betarbet *et al.*, 2000; Perier *et al.*, 2003).

Ao contrário dos modelos induzidos por 6-OH-DA e por MPTP, o modelo de DP induzido por rotenona é claramente capaz de promover a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc em associação com a formação de corpos de Lewy. Em contrapartida, a severidade dos danos estriatais dopaminérgicos mostraram-se altamente

variáveis dentro de uma mesma linhagem de ratos (Betarbet *et al.*, 2000; Perier *et al.*, 2003).

Betarbet *et al.* (2000) produziram um modelo de DP com a infusão intravenosa crônica de rotenona através de cânulas ligadas a mini-bombas osmóticas inseridas na jugular de ratos da linhagem Lewys. Esse modo de administração foi escolhido devido à alta hidrofobicidade e insolubilidade da rotenona em solventes aquosos. Os ratos desenvolveram degeneração progressiva de neurônios nigrais, com diminuição da imunorreatividade contra tirosina hidroxilase, transportador de dopamina e transportador vesicular de monoaminas. Os neurônios nigrais remanescentes apresentaram inclusões citoplasmáticas com reatividade a anticorpos contra ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína, apresentando à microscopia eletrônica formações densas circundadas por elementos fibrilares, similares aos corpos de Lewy. Além disso, os ratos mostraram bradicinesia, locomoção instável e alguma evidência de tremor, sendo que estes déficits melhoraram após tratamento com apomorfina, um agonista do receptor de dopamina. Entretanto, a patologia semelhante à DP só foi evidente em metade dos animais intoxicados com rotenona.

Muitos estudos têm demonstrado que os neurônios dopaminérgicos são mais suscetíveis a insultos ambientais e endógenos. Um dos fatores responsáveis por esta característica pode ser o fato de que esta população neuronal recebe aferências glutamatérgicas diretas de diferentes vias, como por exemplo, o núcleo subtalâmico e o tegmento pré-pontino. A atividade destas aferências glutamatérgicas resulta em ligeiro aumento na concentração intracelular de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) nos neurônios dopaminérgicos da SNpc, requerendo maior atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase e alto consumo de energia.

Isto leva ao aumento na atividade mitocondrial, com consequente geração de ERO, fazendo com que esta população neuronal seja mais suscetível a insultos ambientais ou endógenos. Um dos fatores que pode estar envolvido na toxicidade da rotenona à população dos neurônios dopaminérgicos é o fato de, após a inibição do complexo mitocondrial I, haver o aumento na produção de ERO e subsequente depleção de ATP, o que pode aumentar ainda mais a suscetibilidade desta população de neurônios à rotenona (Alam & Schmidt, 2002; Betarbet *et al.*, 2000).

Em outro estudo realizado por Sherer *et al.* (2003), foi notada intensa ativação microglial no estriado e na SN nos animais tratados com rotenona, com menor ativação no córtex, anterior à perda neuronal dopaminérgica e mais evidente nos animais que apresentaram a lesão visível ao microscópio óptico, indicando um possível papel da resposta inflamatória na degeneração desta população neuronal. Além disso, também foi evidenciada limitada astrocitose reativa na área subjacente à lesão, resultados que não indicam a participação da astrocitose reativa na toxicidade da rotenona e que também estão de acordo aos achados em humanos (Mirza *et al.*, 2000).

Apesar de a rotenona ser um composto lipofílico e ter a capacidade de atravessar membranas biológicas, a degeneração neuronal induzida por esta toxina parece ser seletiva para neurônios dopaminérgicos após tratamento crônico, ocorrendo preservação dos elementos pós-sinápticos no estriado, tanto no modelo de intoxicação utilizado por Betarbet *et al.* (2000) quanto no uso da via de administração subcutânea (Sherer *et al.*, 2003b). No entanto, contraditoriamente, outros estudos verificaram perda neuronal em diversas áreas do encéfalo e em diferentes populações neuronais (Höglinger *et al.*, 2003;

Ferrante, *et al.*, 1997), além de diminuição nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal (Alam & Schmidt, 2002).

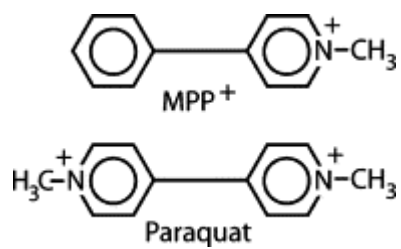
Em outro estudo semelhante, Alam & Schmidt (2004) verificaram que os animais que apresentaram déficits motores após exposição à rotenona responderam positivamente ao tratamento com L-DOPA, mostrando melhora significativa com o tratamento, o que alimenta a controvérsia a respeito da seletividade do composto para neurônios dopaminérgicos e acerca do melhor modelo animal para o estudo dos mecanismos subjacentes à neurodegeneração na DP.

#### 1.2.1.4. Paraquat

A administração do herbicida paraquat (N,N'-dimetil-4-4'-bipiridínio) também induz a um modelo tóxico de DP. Como notado na Figura 4, o paraquat possui similaridade estrutural com o MPP<sup>+</sup>, mas não atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica. A toxicidade do paraquat parece estar relacionada com a formação de radicais superóxido (Day *et al.*, 1999). A administração sistêmica de paraquat em camundongos leva a degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc acompanhada por alteração na expressão e no metabolismo da proteína  $\alpha$ -sinucleína, causando fibrilação, agregação e/ou aumento na imunorreatividade para esta proteína em diversas áreas do SNC, como mesencéfalo, SNpc e córtex frontal (Manning-Bog *et al.*, 2003, 2002; McCormack *et al.*, 2002). Não se sabe ao certo se a toxicidade deste composto é realmente seletiva para neurônios dopaminérgicos ou se outras populações de neurônios são similarmente afetadas.



A vantagem deste novo modelo é a capacidade de produzir perda neuronal dopaminérgica, além de inclusões positivas para  $\alpha$ -sinucleína, de grande valor para o estudo do papel da  $\alpha$ -sinucleína na neurodegeneração (Manning-Bog *et al.*, 2003).



**Figura 4:** similaridade estrutural entre os compostos MPP<sup>+</sup> e paraquat. Modificado de Dauer & Przedborski, 2003.

#### 1.2.1.5. Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

O lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* é uma toxina bacteriana amplamente utilizada em modelos de inflamação, *in vivo* e *in vitro*, e que tem sido muito útil em estudos a respeito do papel da inflamação na patogênese da doença de Parkinson em modelos experimentais.

Alguns autores sugerem que a degeneração de neurônios dopaminérgicos pode ser influenciada por reação glial concomitante. Herrera *et al.* (2000) demonstraram que uma simples injeção intranigral de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos promoveu lesão na SNpc, com diminuição na população de neurônios dopaminérgicos e com a preservação das populações de neurônios que utilizam GABA (ácido gama-aminobutírico) ou serotonina como neurotransmissor. Esta lesão foi acompanhada de reação inflamatória, sendo mais proeminente na SN que no estriado, com intenso recrutamento de células mononucleares dos vasos sanguíneos para a SN.

Mais recentemente, os mesmos autores mostraram que a dexametasona, uma potente droga antiinflamatória, conferiu proteção contra a diminuição nos níveis de catecolaminas, além de reduções tanto na atividade quanto na imunomarcção da enzima tirosina hidroxilase, após injeção de LPS (Castano *et al.*, 2002).

Em comparação ao LPS, a 6-OH-DA e o MPP<sup>+</sup> são indutores de neurodegeneração muito mais potentes devido à alta atividade do sistema de captação de dopamina na SN, produzindo morte de neurônios diretamente pela produção de radicais livres ou inibição mitocondrial, respectivamente, enquanto que o LPS age indiretamente, via ativação microglial e liberação de produtos neurotóxicos (Herrera *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual as células microgliais podem amplificar os danos celulares ainda não está claro. Entretanto, os fatores envolvidos nesses efeitos deletérios são muito provavelmente as citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$  - do inglês *Tumor Necrosis Factor-alpha*), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Adicionalmente, foi observada uma densidade elevada de células gliais expressando TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  na SN de pacientes com a DP em relação a pacientes controle (Hartmann, 2003).

Dois mecanismos, não totalmente exclusivos, podem explicar o papel deletério das citocinas na DP. Primeiro, as citocinas pró-inflamatórias podem induzir a produção de óxido nítrico em células gliais e, assim, promover estresse oxidativo. O segundo mecanismo é mais direto e ocorre pela ativação de receptores de TNF- $\alpha$  nos neurônios dopaminérgicos da SN, ativando vias apoptóticas (Boka *et al.*, 1994; Hartmann, 2003).

Este modelo tem como atrativo a possibilidade de explorar a participação de agentes pró-inflamatórios associados à patogênese da DP, bem como futuras estratégias terapêuticas com a utilização de agentes antiinflamatórios.

#### 1.2.1.6. *Drosophila*

Os mecanismos de morte celular neuronal que acompanham doenças neurodegenerativas são bastante conservados desde os invertebrados até os humanos, o que tem levado ao desenvolvimento de modelos em organismos em que se possa proceder à dissecação da genética desses mecanismos, tirando vantagem da possibilidade de promover

a expressão de mutações definidas em genes de invertebrados homólogos aos genes causadores de doenças em humanos.

Dentro dessa linha de raciocínio, Feany & Bender (2000) desenvolveram um modelo de DP no gênero *Drosophila*, a fim de demonstrar os efeitos causados por expressão transgênica de  $\alpha$ -sinucleínas normais ou das formas mutantes associadas à DP em diferentes tipos celulares. Estes autores demonstraram que o aumento na expressão da forma normal de  $\alpha$ -sinucleína em neurônios era capaz de reproduzir três aspectos chaves da DP: início tardio, depleção seletiva de neurônios dopaminérgicos e produção de agregados citoplasmáticos contendo  $\alpha$ -sinucleína, semelhantes aos corpos de Lewy observados em humanos com DP. Além disso, a expressão das formas mutante e normal da  $\alpha$ -sinucleína na retina resultou em neurodegeneração, o que sugere ser a toxicidade devido a esta proteína uma característica não-exclusiva de neurônios dopaminérgicos. As moscas transgênicas também apresentaram déficits motores progressivos (perda precoce da capacidade de escalar). Espera-se que o desenvolvimento de um modelo confiável da DP, a mais comum desordem de movimento e a segunda doença neurodegenerativa mais comum venham a servir ao estudo da análise genética desta importante patologia.

#### 1.2.1.7. Camundongos transgênicos

Camundongos que são desprovidos do gene da proteína  $\alpha$ -sinucleína são viáveis, férteis e mostram estrutura encefálica normal, sem déficits nas fibras, terminais e corpos celulares de neurônios dopaminérgicos. Não mostram evidências de fenótipo parkinsoniano, sugerindo que a perda da função da  $\alpha$ -sinucleína não está relacionada a

causa da DP, e que mutações no gene da  $\alpha$ -sinucleína são mais provavelmente causadoras de DP pelo ganho de uma nova função (Beal, 2001; Dauer & Przedborski, 2003).

Camundongos que têm expressão aumentada de  $\alpha$ -sinucleína desenvolvem progressiva acumulação de inclusões citoplasmáticas imunorreativas para  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina em diversas áreas do SNC. Não foi verificada perda de neurônios dopaminérgicos na SN, mas houve perda de terminais nesta população de neurônios.

Esse modelo é desprovido de várias das principais características da DP, apesar de reproduzir alguns aspectos da demência com corpos de Lewy (Beal, 2001).

### **1.2.2. Modelos *in vitro* da doença de Parkinson**

Os modelos experimentais *in vitro* são ótimas ferramentas para se estudar de forma mais minuciosa alguns achados observados em modelos *in vivo*. Além disso, modelos *in vitro* têm a vantagem de se poder diminuir ao máximo as variáveis presentes em certas situações *in vivo*, bem como de oferecer a oportunidade de se estudar mecanismos de ação envolvidos em certas perguntas experimentais.

Fatias de tecido mesencefálico, culturas de neurônios de mesencéfalo dissociados e linhagens de células derivadas de neurônios dopaminérgicos (e.g., células SH-SY5Y de humanos e PC12 de ratos) são adequadas para estudar detalhadamente mecanismos de degeneração neuronal dopaminérgica e novos agentes farmacológicos relacionados à DP (Kitamura *et al.*, 2000; Shimohama *et al.*, 2003).

Neurotoxinas clássicas como o MPP<sup>+</sup> e a 6-OH-DA são inadequadas para administração sistêmica porque não atravessam a barreira hematoencefálica. Entretanto, sua captação para o interior de sinaptossomos no SNC é similar em primatas e roedores e, portanto, habilita-as a serem utilizadas em modelos *in vitro* (Kitamura *et al.*, 2000).

A administração de 6-OH-DA em culturas primárias mistas de mesencéfalo de rato resultou em acentuada diminuição na viabilidade celular, como avaliada pelo método do MTT (descrito na metodologia), bem como em indícios de peroxidação lipídica e aumento na produção de NO (Nobre Jr. *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que tanto o MPP<sup>+</sup> quanto a 6-OH-DA reduzem a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em culturas primárias de mesencéfalo (Carrasco & Werner, 2002; Nobre Jr. *et al.*, 2003). Entretanto, os mecanismos celulares que levam à morte celular induzida por estas toxinas são distintos (Nobre Jr. *et al.*, 2003).

A neurotoxicidade induzida por glutamato proporciona um modelo farmacológico amplamente usado para se estudar estresse oxidativo. Utilizando este modelo, Sawada *et al.* (1996) mostraram que neurônios dopaminérgicos são mais resistentes ao óxido nítrico que neurônios não dopaminérgicos. Entretanto, após pré-tratamento com MPP<sup>+</sup>, a resistência ao óxido nítrico é diminuída e a neurotoxicidade devida ao glutamato é aumentada (Sawada *et al.*, 1996b).

Outra droga bastante utilizada em modelos *in vitro* é a toxina LPS, quando o objetivo do estudo é verificar o papel da resposta inflamatória em distúrbios neurodegenerativos. Em culturas de tecido nervoso, o LPS ativa células gliais e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de causar morte de neurônios dopaminérgicos em culturas mistas neurônio/glia, mas não em culturas neuronais semipuras

(Bronstein *et al.*, 1995). Isso indica que a produção de fatores gliais induzidos por LPS, como citocinas, pode induzir morte neuronal, ao menos sob condições experimentais *in vitro*.

Le *et al.* (2001) mostraram que a administração de LPS em culturas primárias de mesencéfalo e culturas secundárias de células da linhagem dopaminérgica MES 23.5 promoveu ativação microglial, aumento na produção de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , bem como de ERO, causando lesão celular nos dois tipos de culturas testados.

Outro fator importante observado no modelo de DP induzido por LPS é a seletividade neuronal. Diversos experimentos são relatados a seguir que demonstram efeitos diferenciais de compostos neurotóxicos quando utilizam-se populações neuronais distintas e diferentes composições de elementos da neuroglia nas preparações. Kim *et al.* (2000), por exemplo, demonstraram que culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo, de hipocampo e de córtex cerebral apresentaram suscetibilidades diferentes quando expostas à mesma dose de LPS. Assim, as culturas feitas com tecido mesencefálico apresentaram maior sensibilidade à toxicidade do LPS, com redução da população neuronal dopaminérgica e outros neurônios, e aumento na produção de fatores inflamatórios. Em contraste, as culturas derivadas de hipocampo e córtex apresentaram resistência contra as doses potencialmente tóxicas para culturas de mesencéfalo. Estes autores creditaram esta maior suscetibilidade das culturas mesencefálicas ao maior número de células microgliais ativadas, em comparação às culturas derivadas de hipocampo e de tecido cortical.

Outro modelo *in vitro* de DP bastante utilizado para se estudar mecanismos de morte celular é o induzido por rotenona. Esta toxina tem se mostrado tóxica tanto em



culturas primárias quanto para linhagens celulares imortalizadas. Sherer *et al.* (2002b) demonstraram que células de neuroblastoma humano expostas a doses crônicas de rotenona apresentaram agregação protéica e evidências de estresse oxidativo, bem como diminuição da glutatona e aumento de danos oxidativos em proteínas e DNA. Além disso, a rotenona mostrou-se muito mais tóxica para culturas primárias mistas de neurônios/glia que para culturas enriquecidas de neurônios de tecido mesencefálico (Gao *et al.*, 2002).

### 1.3. O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO ( $\text{Ca}^{2+}$ ) NA NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA

O cálcio ionizado ( $\text{Ca}^{2+}$ ) é o elemento de transdução de sinal mais comum em células, ocorrendo desde bactérias até neurônios especializados. É, diferente de muitas outras moléculas de segundos mensageiros, paradoxalmente, essencial à vida, apesar de concentrações intracelulares muito elevadas levarem à morte celular. O  $\text{Ca}^{2+}$  não pode ser metabolizado como outras moléculas de segundos mensageiros, razão pela qual as células necessitam regula com precisão seus níveis intracelulares com numerosas proteínas. Estas proteínas podem ser divididas em dois grupos: proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas especializadas na extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os níveis intracelulares normais atingem aproximadamente 100 nM, sendo muitas vezes menor que a concentração de 1 a 2 mM encontrada no meio extracelular. Grande quantidade de proteínas celulares tem sido adaptadas para se ligar fortemente ao  $\text{Ca}^{2+}$ , em alguns casos simplesmente para tamponar ou para diminuir os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Uma das vias envolvidas na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$ , exclusiva de células excitáveis, ocorre através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  sensíveis à voltagem que, quando ativados, promovem um drástico aumento citosólico da concentração deste íon. Esta via é responsável por inúmeros eventos característicos desta classe de células, como contração muscular e exocitose de neurotransmissores, por exemplo. Vários tipos destes canais têm sido descritos na literatura, que diferem entre si pela sensibilidade a ativadores e inibidores, probabilidade e velocidade de abertura (Nestler *et al*, 2001).

O canal mais comum desta família é o do tipo L (do inglês “*large current* ou *long open time*”), ativados por despolarizações acentuadas (potencial de membrana em torno de  $-20\text{mV}$ ), com tempo de abertura relativamente longo antes de sua inativação ( $\cong 500$  ms ou mais), e são bloqueados por diidropiridinas, como a nifedipina, por exemplo; os canais do tipo L estão localizados principalmente no corpo celular e dendritos proximais dos neurônios. Seu papel ainda não está bem esclarecido, entretanto se admite que estejam envolvidos com ativação de segundos mensageiros e mudanças na transcrição gênica.

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo T (do inglês *transient* ou *tiny current*) se abrem com potenciais de membrana mais negativos, próximos do potencial de repouso ( $-40\text{mV}$ ); exibem inativação dependente de voltagem; acredita-se que, além de estarem envolvidos na regulação das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, promovam uma corrente marcapasso nos neurônios talâmicos, gerando descargas corticais rítmicas associadas com crises de ausência (epilepsia).

Os canais do tipo N (do inglês *neuronal* ou *neither L nor T*) são ativados por grandes despolarizações; a ativação e inativação possuem cinética rápida (inativação em

torno de 80ms); são mais conhecidos por sua regulação da liberação de neurotransmissores, principalmente em neurônios corticais.

Os canais do tipo P, primeiramente descritos nas células de Purkinje cerebelares, têm condutância similar aos canais do tipo N, porém com inativação lenta. Semelhante aos canais do tipo N, também estão envolvidos na liberação de neurotransmissores em alguns neurônios.

Os canais do tipo Q são ativados por grandes despolarizações e são rapidamente inativados. Estão localizados principalmente nas células granulares cerebelares, neurônios piramidais hipocampais e pituitária. Estão envolvidos na liberação de neurotransmissores.

O retículo endoplasmático age como uma rede para as proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  e seqüestra ativamente este íon para o espaço intraorganelar. Esta captação é feita pela ação das chamadas bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , que são proteínas transmembrana existentes no retículo endoplasmático e que utilizam ATP no bombeamento deste íon para dentro do retículo endoplasmático, contra o gradiente de concentração. Dentro da organela, o  $\text{Ca}^{2+}$  é seqüestrado por altas concentrações de moléculas-tampões especializadas, como por exemplo, a calsequestrina, a calreticulina e a endoplasmína, que ainda não tem função conhecida, mas agem como moléculas armazenadoras de baixa afinidade e alta capacidade de captação (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Além do retículo endoplasmático, as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  também podem ser encontradas na membrana celular, com o mesmo objetivo de promover a extrusão e manter os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  baixos.

Outra organela que desempenha um papel chave em inúmeros processos celulares que ocorrem com gasto de energia é a mitocôndria. Entre estes processos,

podemos citar a via de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  (Ba *et al.*, 2004), que depende da produção de ATP para manter sua homeostase.

Para manter a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ , a mitocôndria acumula este íon até uma concentração de 0,5 mM na sua matriz devido ao alto gradiente eletroquímico. Esta captação é feita pelo chamado uniporte mitocondrial seletivo ao  $\text{Ca}^{2+}$ , que tem menor afinidade que as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  e provavelmente são significantes apenas quando as concentrações citosólicas atingem níveis acima de 0,5  $\mu\text{M}$ , de vez que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é baixa dentro da mitocôndria quando a célula está em repouso (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Sendo assim, para que uma célula saudável mantenha todas as suas funções fisiológicas normais, há a necessidade de um refinado mecanismo de controle da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ . No caso de haver, por qualquer motivo, quebra de continuidade neste mecanismo, este íon tornar-se-á um agente potencialmente lesivo à célula, podendo levá-la à morte.

Neste contexto, Sherer *et al.* (2001) verificaram que a exposição crônica de células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y à rotenona resultou em respostas anormais no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por carbacol, um agonista não-seletivo de receptores da acetilcolina. Essas respostas anormais foram abolidas após administração de nifedipina, um inibidor de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L, e vermelho de rutênio, um inibidor da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  da mitocôndria. Estes resultados sugerem que um possível defeito na cadeia transportadora de elétrons, como uma redução crônica na sua atividade,

pode alterar eventos de sinalização, promovendo a ativação mecanismos de morte celular em doenças neurodegenerativas.

Em outro modelo experimental, a administração de nifedipina, um bloqueador de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, mas não de  $\omega$ -conotoxina, cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) e flunarizina, bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T, reverteram a perda de viabilidade celular em linhagem de células SK-N-SH intoxicadas com proteína  $\beta$ -amilóide *in vitro*, sugerindo um possível papel do  $\text{Ca}^{2+}$  no mecanismo de toxicidade. Porém, nenhum dos bloqueadores investigados mostrou efeitos neuroprotetores contra a toxicidade do MPTP (Ba *et al*, 2004).

O MPP+, quando administrado concomitantemente com 6-OH-DA ou dopamina, diminuiu significativamente a habilidade da mitocôndria de reter o  $\text{Ca}^{2+}$  endógeno. Desse modo, um distúrbio na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial pode levar a ativação de vias de morte celular (Frei and Richter, 1986).

Assim, é possível que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  exerça algum papel na neurotoxicidade induzida por rotenona. Dessa maneira, foram utilizadas cinco drogas que alteram a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  com o objetivo de verificar possíveis influências nos mecanismos de toxicidade da rotenona.

#### 1.4. ESTRESSE OXIDATIVO E AGENTES ANTIOXIDANTES

Como descrito anteriormente, os neurônios dopaminérgicos podem estar em um microambiente particularmente fértil para a geração de radicais livres. A maior parte da

energia necessária para a sobrevivência do tecido nervoso é proveniente da fosforilação oxidativa mitocondrial, uma importante fonte de radicais livres. Porém, as células também apresentam sistema antioxidante natural que previnem danos causados por estas moléculas altamente reativas. Na literatura, existem evidências que danos oxidativos estão implicados na patogênese de diversos distúrbios neurodegenerativos, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Huntington, entre outras (Migliore & Coppedè, 2009).

Assim, estratégias que visam prevenção contra ação de radicais livres no tecido nervoso podem ser benéficos em processos degenerativos. Com isso, produtos naturais têm sido fonte atraente de compostos antioxidantes com propriedades com propriedades farmacológicas promissoras, desempenhando papel importante em estudos que visam o desenvolvimento de drogas para tais doenças.

*Swietenia macrophylla*, mais conhecida como mogno, da família das Meliáceas, está distribuída na América Central e do Sul (Brown *et al.*, 2003). A madeira é muito utilizada na produção de móveis finos e armários, acabamentos interiores, barcos, instrumentos musicais, entre outras coisas; suas folhas podem ser utilizadas como agente corante (Mahale *et al.*, 2006), porém pouco se conhece acerca das potenciais fontes de componentes antioxidantes deste vegetal. Falah e colaboradores (2008) estudaram a camada delgada do caule de *S. macrophylla* e isolaram compostos com forte poder antioxidante. No entanto, apesar do resultado promissor, poucos estudos estão disponíveis na literatura acerca das propriedades antioxidantes dos compostos derivados do mogno.

Análises preliminares, realizadas pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LabCrol), do Instituto de Química da Universidade Federal do Pará, utilizando

Espectrofotometria de Massa – Cromatografia Líquida (LC-MS), demonstraram a presença de compostos fenólicos e flavonóides (tais como ácido gentísico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido p-hidróxi-benzóico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido sináptico, ácido cinâmico, 3-O- $\beta$ -glicopiranosil quercetina, 3-O- $\beta$ -raminopiranosilquercetina e 3-O- $\alpha$ -raminopiranosilkamferol) em amostra liofilizada obtida a partir de extrato bruto de folhas de mogno. A amostra liofilizada em questão, utilizada neste estudo, apresenta elevada capacidade antioxidante, como medida pelo teste TEAC (atividade antioxidante equivalente a trolox) e comparada com o teor em fenólicos totais (TP) (dados não publicados).

Tendo em vista o potencial dessa linha de pesquisa e a exiguidade de estudos relacionados ao tema, entendemos que seria interessante investigar possíveis efeitos neuroprotetores deste extrato aquoso de folhas de mogno, relacionados às suas propriedades antioxidantes, em um modelo *in vitro* de doença de Parkinson.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar um modelo *in vitro* da DP com utilização da rotenona em culturas primárias para investigação da influência das vias de sinalização dependentes dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  no mecanismo de toxicidade, bem como a ação do extrato aquoso de folhas de mogno (*S. macrophylla*) com alto poder antioxidante compostos antioxidantes e o padrão de morte celular induzido pelo agente neurotóxico.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a influência da exposição à diferentes concentrações de rotenona (10, 20, 30, 40 e 50 nM) sobre a viabilidade de culturas primárias de neurônios de ratos da linhagem Wistar;
- Comparar experimentos com culturas de populações neuronais do hipocampo e do mesencéfalo ventral de ratos neonatos com o objetivo de avaliar possíveis diferenças regionais de vulnerabilidade;
- Avaliar a influência do tempo de exposição (1, 3, 5 e 7 dias) sobre o efeito neurotóxico da rotenona em culturas derivadas de mesencéfalo ventral;
- Investigar o envolvimento de diferentes vias dependentes de íons  $\text{Ca}^{2+}$  no mecanismo de neurotoxicidade da rotenona;
- Investigar o efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (antioxidante) sobre toxicidade induzida por rotenona;
- Investigar o padrão de morte celular no modelo experimental de parkinsonismo induzido por rotenona.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos neonatos, machos ou fêmeas, da linhagem Wistar com até quatro dias de idade, entre PND2 e PND5, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas no guia Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação, da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

#### 3.2. CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS

Os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por decapitação abrupta, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de petri contendo etanol 70%. Após a decapitação, foi realizada a dissecação do encéfalo, feita dentro da cabine, sobre uma placa de petri com meio de dissecação estéril gelado. Em seguida, o encéfalo foi manipulado em uma outra placa com meio de dissecação novo, a fim de se minimizar os riscos de contaminação. O hipocampo ou mesencéfalo ventral, livres de meninges, foram microdissecados em meio de dissecação estéril (Smeyne & Smeyne, 2002). As regiões neuronais isoladas foram então incubadas por cerca de 5 a 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina-EDTA a 0,05% (Invitrogen) em solução livre de cálcio e magnésio (CMF – do inglês *calcium magnesium free*) para digestão enzimática, e depois transferidas para meio de cultura Meio Essencial Modificado de Dulbecco (DMEM, Invitrogen) contendo soro

bovino fetal (FBS, SIGMA) a 10% e soro de cavalo (HS, SIGMA), então foram triturados mecanicamente de maneira suave com o auxílio de pipeta Pasteur. O processo de trituração foi repetido com outra pipeta Pasteur flambada até metade de seu diâmetro de ponta original. As células contidas no sobrenadante foram então plaqueadas a uma densidade aproximada de  $5 \times 10^5$  células/poço em 1-1,5 mL do meio de cultura, em placas de cultura multipoços cobertas com poli-L-lisina e mantidas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada na incubadora (Costa *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002).

Para obtenção de culturas mistas neurônio/glia, as células foram inicialmente plaqueadas em 1-1,5 ml de meio NBA suplementado com 10% de FBS, 10 % de soro de cavalo, 25 µM de glutamato, 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAX<sup>TM</sup>-1 e 0,25 mM de L-glutamina. Após 3 dias, o meio de cultura foi trocado. Foram realizadas trocas regulares do meio de cultura a cada três a quatro dias (Gao *et al.*, 2002).

Para o tratamento, as culturas foram mantidas em meio de cultura (NBA ou DMEM) suplementado com 2 % de FBS, 2 % HS, 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAX<sup>TM</sup>-1 e 0,25 mM de L-glutamina (Gao *et al.*, 2002).

### 3.3. CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE ESTRIADO E MESENCÉFALO VENTRAL

Os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por decapitação abrupta, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de petri contendo etanol 70%. Após a decapitação, foi realizada a dissecação do encéfalo, feita dentro da cabine, sobre uma placa de petri com meio de dissecação estéril gelado. Para a dissecação do estriado e mesencéfalo ventral, foram feitas secções coronais com 250 a 350  $\mu\text{m}$  de espessura do encéfalo com um seccionador, em meio de dissecação estéril gelado. As secções feitas foram deixadas imersas em placa de petri com meio de dissecação estéril gelado. Após o seccionamento da amostra, as regiões neuronais isoladas foram então incubadas colocadas em cubetas com membrana sintética porosa no fundo (Inserts, MILLIPORE) e dispostas nos poços das placas de cultura com meio de NBA ou DMEM sem soro e antibióticos. As placas de cultura multipoços foram mantidas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera umidificada na incubadora (Testa *et al.*, 2005; Plenz & Kitai, 1996). O tratamento procedeu ao sexto dia *in vitro*, perdurando por até 20 dias.

### 3.4. IMUNOCITOQUÍMICA

Para caracterização fenotípica das culturas, as células foram plaqueadas em poços contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro cobertas com poli-L-lisina, onde foi feita imunocitoquímica de acordo com o protocolo descrito na literatura (Kim, *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000).

Os neurônios dopaminérgicos foram marcados com o anticorpo contra a enzima tirosina hidroxilase (anti-TH), enzima passo-limitante na produção de dopamina. A microglia foi visualizada pela marcação do receptor do complemento tipo 3 (CR3) com o anticorpo OX-42, e os astrócitos foram marcados contra a proteína acídica fibrilar glial, uma proteína do filamento intermediário restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP. Os neurônios foram marcados com o anticorpo contra a proteína associada a microtúbulo tipo 2. Todos os anticorpos foram produzidos em camundongo.

Ao sétimo dia de cultura, as placas foram lavadas em PBS e fixadas com formaldeído 3,7% em PBS em por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as culturas foram então lavadas novamente e incubadas por 12 horas a 4°C em anticorpo primário diluídos em PBS com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de jumento, nas seguintes titulações: anti-TH, 1:1.000; OX-42, 1:1.000; anti-GFAP, 1:2.000; anti-MAP-2, 1:1.000.

Após incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS e, em seguida, incubadas por 2 horas em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e o anticorpo secundário biotinizado ou conjugado com fluorocromo (AlexaFluor 488 ou AlexaFluor 594) feito em jumento na titulação de 1:200.

Após três lavagens, as culturas incubadas com anticorpo biotinizado foram incubadas por 1 hora com os reagentes Vectastain ABC (VECTOR) diluídos de acordo com a sugestão do fabricante em PBS.

Para imunofluorescência, os núcleos foram marcados com DAPI (4',6 - diamidino, diamidino, diamidino-2- fenil-indol). A visualização do complexo formado foi

feita através da incubação das culturas com peróxido de hidrogênio e DAB (3,3'-diaminobenzidina) em PBS, ou em microscópio de fluorescência.

O término da reação foi feito com lavagem das culturas em PBS.

As culturas foram então montadas em lâminas e cobertas com meio de montagem e lamínula.

A captura de imagens foi feita em microscópio NIKON Labophot 2 ou microscópio OLYMPUS BX-50 com sistema de fluorescência e captura de imagem.

### 3.5. INTOXICAÇÃO COM ROTENONA

O tratamento foi feito a partir do sétimo dia de cultura com a exposição ao neurotóxico. A solução de rotenona foi preparada a partir da diluição da droga em DMSO (dimetilsulfóxido), com concentrações finais entre 5 a 90 nM, escolhidas segundo experimentos *in vitro* já descritos na literatura com a utilização de preparações similares (Gao *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2002). A cada reposição de meio de cultura, foi desprezado o meio de cultura anterior e colocado meio fresco com nova solução de rotenona. O tratamento com rotenona teve duração de até duas semanas, com o objetivo de construir uma curva temporal de resposta à toxicidade do composto.

### 3.6. O PAPEL DO $\text{Ca}^{2+}$ NA TOXICIDADE DA ROTENONA

Com o objetivo de analisar se o  $\text{Ca}^{2+}$  está envolvido no mecanismo de toxicidade da rotenona foram administradas, concomitantemente à rotenona, drogas que agem nesta via de sinalização.

A fim de verificar se o  $\text{Ca}^{2+}$  exógeno tem algum papel no mecanismo de toxicidade da rotenona, as culturas foram tratadas com 0,5 e 1 mM de EDTA, um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Sherer *et al.*, 2001).

Com o objetivo de verificar um possível papel do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem do tipo L na toxicidade induzida por rotenona, foi administrado 0,1, 0,5 e 1 mM de nifedipina, um inibidor deste tipo de canal (Sherer *et al.*, 2001).

Para avaliar se a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria tem algum papel na toxicidade da rotenona, utilizamos o inibidor da captação de cálcio mitocondrial vermelho de rutênio em concentração de 0,5, 1 e 3  $\mu\text{M}$  (Düzenli *et al.*, 2005).

A fim de estudar o papel do  $\text{Ca}^{2+}$  microsomal na toxicidade da rotenona, utilizamos o inibidor da bomba de cálcio microsomal tapsigargina em concentração de 1, 3 e 5  $\mu\text{M}$  (Salter & Hicks, 1994).

A fim de estudar o papel do trocador de  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  da membrana celular, utilizou-se o bloqueador deste trocador, benzamil, em concentração de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ .

### 3.7. EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DISSOCIADAS E CULTURAS ORGANOTÍPICAS AO EXTRATO AQUOSO DERIVADOS DE FOLHAS DE MOGNO (*Swietenia macrophylla*)

A fim de analisar se a utilização do extrato aquoso obtido a partir de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*), no Laboratório de Cromatografia Líquida – LaCroL - UFPA, cuja composição apresenta catequinas com poder antioxidante, poderia conferir proteção contra os efeitos tóxicos da rotenona, caso tais efeitos estejam relacionados com indução de estresse oxidativo, culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral foram tratadas concomitantemente com rotenona e/ou extrato de mogno.

Para isso, utilizou-se o extrato aquoso obtido a partir de folhas de mogno em concentrações finais variáveis de 1, 10, 15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  (Lopes 2009). O extrato de mogno, por ser aquoso, foi diluído em meio de cultura durante o tratamento.

### 3.8. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular são de extrema importância para diversas aplicações de rotina em biologia celular. Os sais de tetrazolium (*e.g.*, MTT, XTT, NBT) são particularmente úteis neste tipo de análise. Estes sais são clivados até compostos de formazan por enzimas desidrogenases, que pertencem à cadeia respiratória da mitocôndria, e estão ativas apenas em células metabolicamente intactas.

O ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) foi utilizado neste trabalho como uma ferramenta para a determinação

quantitativa de efeitos antiproliferativos ou citotóxicos mediados pela rotenona e para a medida da suposta interferência dos íons cálcio na toxicidade deste composto. O método é baseado na clivagem do sal de tetrazolium amarelado MTT em formazan, de coloração azul escura ou púrpura, por células metabolicamente ativas.

O sal de tetrazolium foi diluído em PBS em concentração de 5 mg/ml. A cada poço da placa de cultura foi adicionado 50  $\mu$ L desta solução, sendo posteriormente incubada por 3 horas em condições normais de cultura. Os cristais de formazan do MTT foram então solubilizados em isopropanol e quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm.

Um aumento no número de células vivas resulta em aumento da atividade metabólica total, o que leva a formação de cor mais forte. Utilizando-se a absorbância média do controle negativo como 100%, será calculada a porcentagem de viabilidade de todas as amostras testes usando-se a absorbância média de cada amostra (Mosmann, 1983).

### 3.9. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DA LDH

Os ensaios de proliferação, viabilidade e morte celular, como o ensaio da liberação da enzima lactato desidrogenase, são de extrema importância para diversas aplicações de rotina em biologia celular. A enzima lactato desidrogenase é uma enzima da classe das *oxidoreductases* que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD<sup>+</sup>, que atua como doador ou acceptor de hidrogênio.





A LDH está presente no citoplasma de todas as células do organismo. Em condições de lesão celular associada à lesão de membrana celular, pode ocorrer extravasamento do conteúdo citoplasmático desta enzima, o que possibilita sua utilização para caracterização de processos de morte celular por necrose.

Assim, para investigar os processos de morte celular induzidos por rotenona, além do método colorimétrico do MTT, utilizou-se o método colorimétrico de quantificação da LDH no sobrenadante de culturas expostas ao agente neurotóxico. A técnica colorimétrica baseia-se na reação lactato/piruvato com a geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) (esquemática acima), que reduz a fenazina metossulfato e este, o alúmen férrico. O alúmen ferroso então reage com a 1,10-fenantrolina, formando um complexo colorido, monitorado espectrofotometricamente (490 nm) (Koh & Chol, 1987).

### 3.10. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE NITRITO NO SOBRENADANTE DE CULTURAS EXPOSTAS À ROTENONA

Sob certas condições de estresse, as células podem aumentar a produção de uma série de substâncias, denominadas de radicais livres, altamente reativas, podendo ter como consequência agressão celular devido à formação de complexos com macromoléculas celulares. Entre estas espécies altamente reativas, o Óxido Nítrico (NO) pode ser

produzido, reagindo com moléculas celulares e causando aumento no processo de agressão celular.

O NO é uma molécula altamente reativa e facilmente convertida para nitrito, estando presente no sobrenadante de culturas. Assim, a análise dos níveis de nitrito serve como ferramenta de quantificação indireta dos níveis de NO produzidos pelas células.

Neste trabalho, a quantificação dos níveis de nitrito foi feita por meio do método do reagente de Griess, com sensibilidade de 0,5  $\mu\text{M}$  (Gao *et al.*, 2003a). Resumidamente, utiliza-se solução de revelação à base de Naftil-etilenodiamina e de Sulfanilamida em Ácido Fosfórico. Estas soluções são preparadas no início do experimento e, após, mistura-se com o sobrenadante a ser testado. Em seguida, afere-se a absorbância por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm.

### 3.11. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE NECROSE E APOPTOSE (WESTERN BLOT) EM CULTURAS EXPOSTAS À ROTENONA

A fim de investigar se, nas condições de exposição ao agente neurotóxico, a redução da viabilidade celular está associada à morte celular por necrose e/ou apoptose, foi feita análise quali-quantitativa para os marcadores de morte celular espectrina, calpaína e caspase.

Para isso, após o tratamento com os agentes testados, as culturas foram lavadas em PBS, raspadas da placa com inibidor de protease em PBS e centrifugadas a

10.000g/5min a 4°C. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante, foi feita lise das células com tampão adequado e novamente centrifugado.

A partir do sobrenadante gerado, foi feita dosagem de proteína através de método colorimétrico com um kit BioRad seguindo sugestões do fabricante.

Após a etapa anterior, foi feita corrida em eletroforese da amostra obtida (cerca de 40µg) durante duas horas (90-100 volts) seguida de transferência para membrana de nitrocelulose a 400mA por 1,5 horas (para proteínas de 250-300kDa).

Na etapa seguinte, a membrana foi lavada e corada com Ponceu S, um corante que tem afinidade por proteínas, servindo como indicador que as amostras foram transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após esta etapa foi feito bloqueio com BSA 5 % (Albumina Bovina Sérica) em solução TTBS por 25 minutos para que, em seguida, fosse feita a incubação com anticorpo específico.

Na etapa seguinte foi feita incubação em anticorpo primário (1:300-1:1000) em solução de TTBS + 1 % Leite + 1 % de BSA por 12 horas. A seguir, as membranas foram lavadas em solução TTBS por 3 vezes (10 minutos cada) e incubada em anticorpo secundário (1:1000) por 1,5 horas.

Após incubação em anticorpo secundário, foi feita lavagem em solução TTBS (três vezes – 10 minutos cada) e feita revelação por quimioluminescência.

Para finalizar, as bandas visualizadas foram digitalizadas e a marcação foi quantificada através de análise de densidade óptica.

### 3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos em média  $\pm$  EP (erro padrão médio).

A análise estatística foi feita no programa Microsoft Excel e Bioestat 5.0, onde foi feita a estatística descritiva de cada amostra, além da análise de variância (ANOVA) seguida do teste-t de Dunnet para se observar a diferença entre os grupos, onde foi adotado um valor para  $P < 5\%$  como estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL.

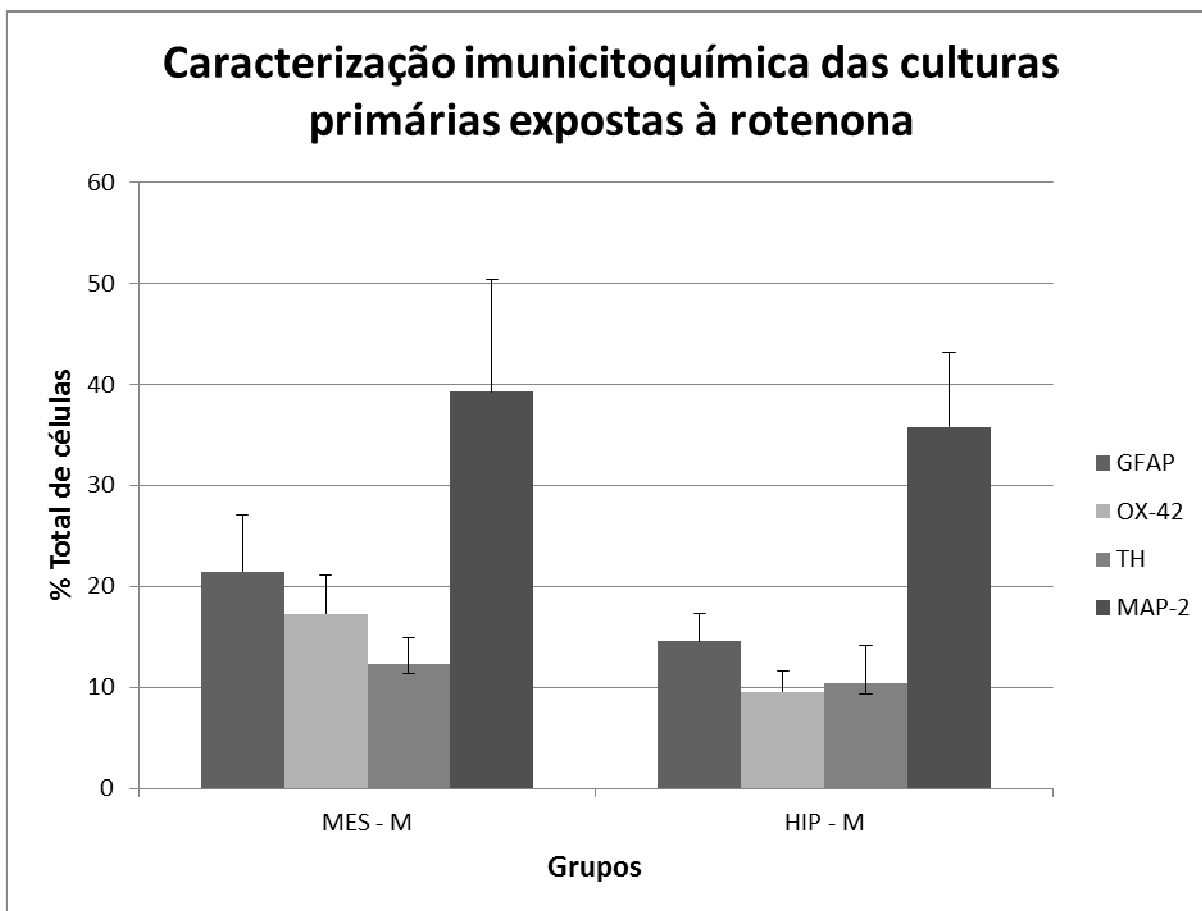
A fim de identificarmos o fenótipo celular presente em nossas culturas primárias derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, foram realizados experimentos de imunocitoquímica com anticorpos para identificação de astrócitos (contra a proteína ácida fibrilar glial - GFAP), microglia (contra o receptor tipo 3 do complemento - OX-42) e neurônios (contra a enzima tirosina hidroxilase - TH e contra a proteína MAP-2). Em todos os casos, foi também realizada contra-coloração pelo método de Nissl ou, em alguns casos, a utilização de DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) para contracoloração de núcleos celulares (Figura 6 e 7).

O padrão imunocitoquímico das culturas foi obtido através da porcentagem do número de células marcadas imunocitoquimicamente (GFAP, OX-42, TH ou MAP-2) em relação ao número total de células, coradas pelo método de Nissl.

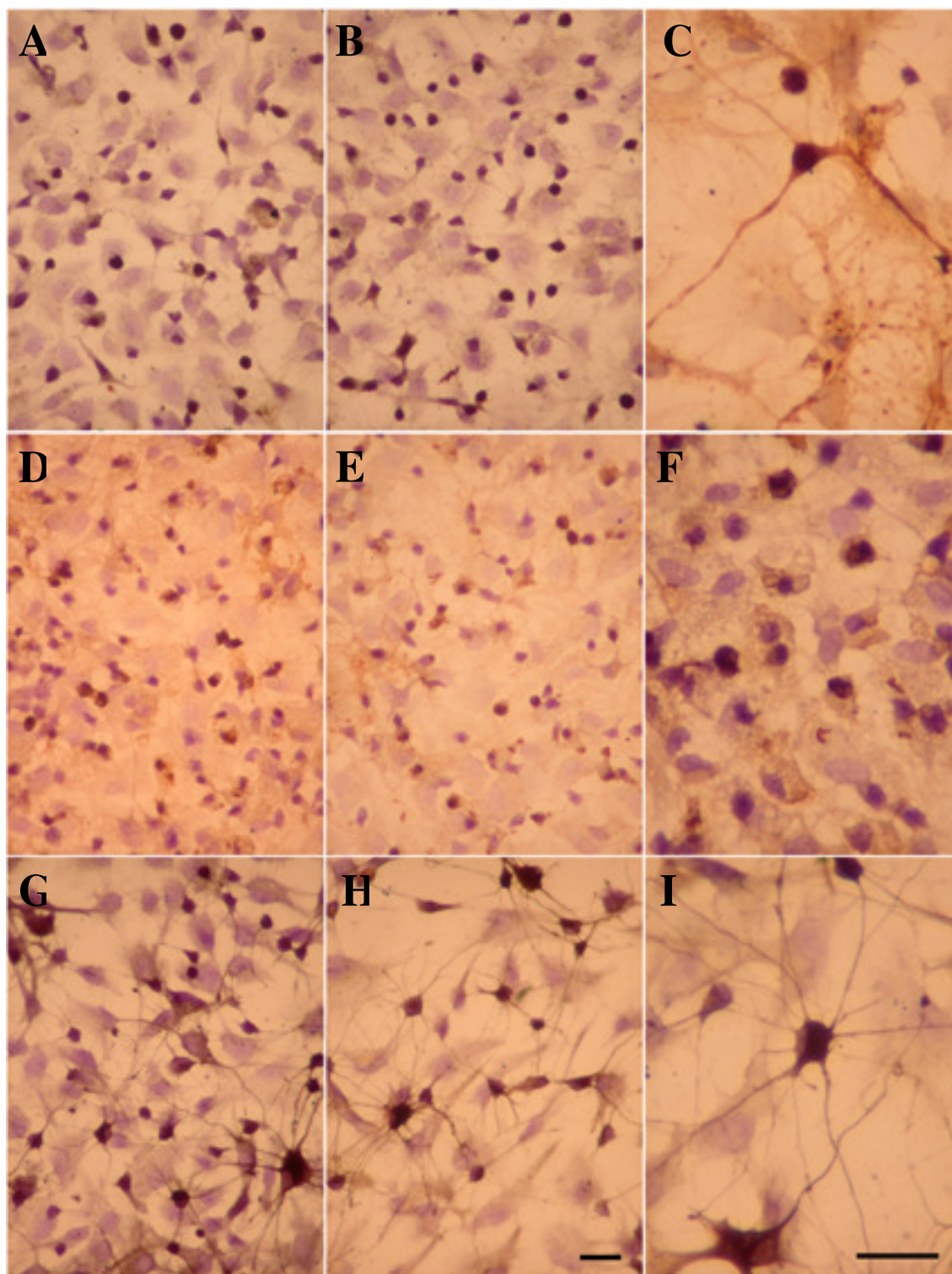
Assim, as culturas mistas derivadas de hipocampo apresentaram  $14,57 \pm 2,74 \%$ ,  $9,58 \pm 1,97 \%$ ,  $10,38 \pm 3,75 \%$  e  $35,78 \pm 7,34 \%$  de células imunorreativas para GFAP, OX-42, TH e MAP-2, respectivamente. As culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram  $27,93 \pm 7,33 \%$ ,  $22,49 \pm 5,00 \%$ ,  $16,02 \pm 3,39 \%$  e  $39,23 \pm 11,20 \%$  de células imunorreativas para GFAP, OX-42, TH e MAP-2, respectivamente. (Figura 5, Tabela 3)

**Tabela 3:** Caracterização imunocitoquímica de culturas neuronais derivadas de hipocampo e mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do número total de células. MES, Mesencéfalo ventral; HIP, Hipocampo.

	<b>MES-M</b>	<b>HIP-M</b>
<b>GFAP</b>	27,93 ± 7,33	14,57 ± 2,74
<b>OX-42</b>	22,49 ± 5,00	9,58 ± 1,97
<b>TH</b>	16,02 ± 3,39	10,38 ± 3,75
<b>MAP-2</b>	39,23 ± 11,20	35,78 ± 7,34

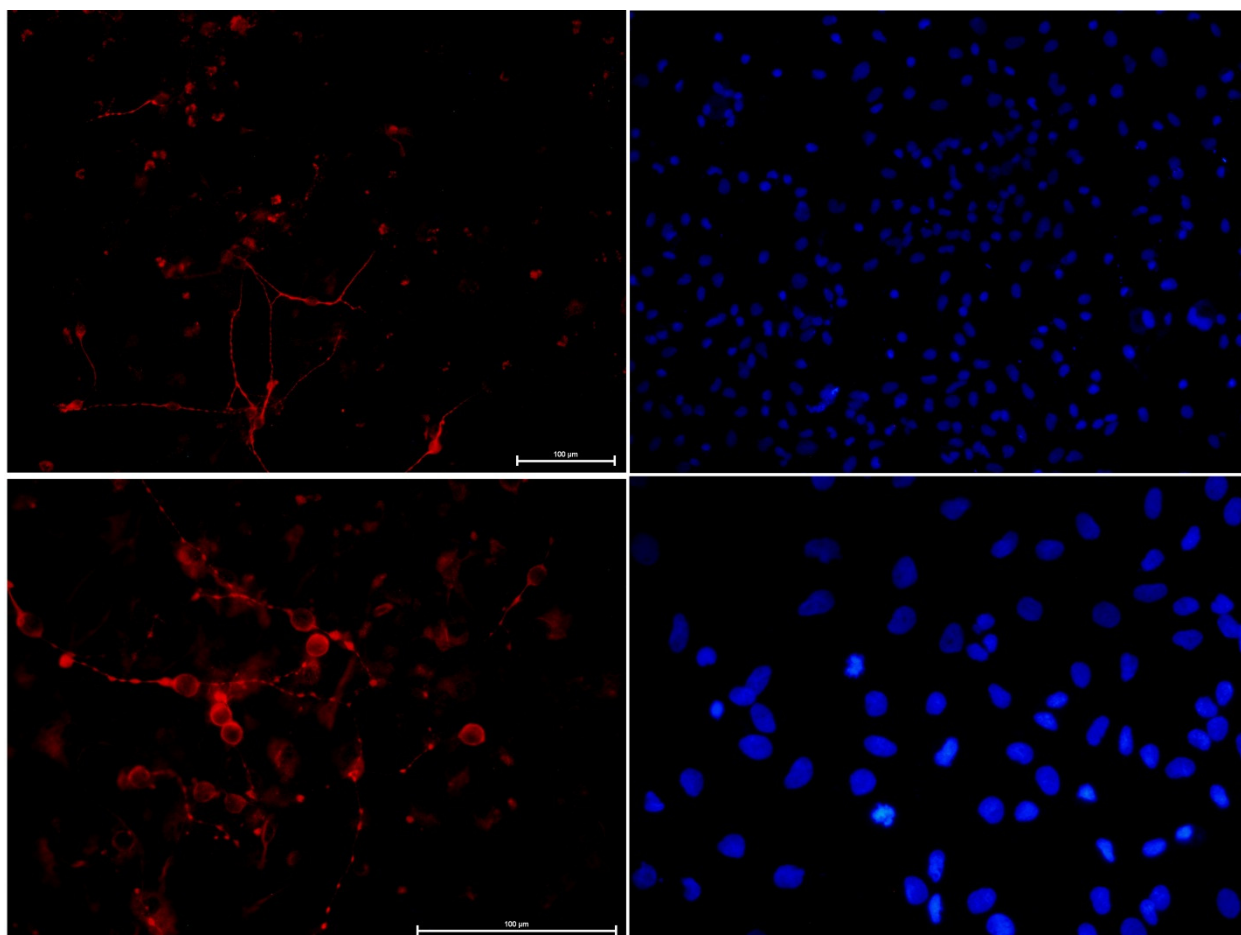


**Figura 5:** Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de mesencéfalo e hipocampo. MES, Mesencéfalo ventral; HIP, Hipocampo; M, Mistas. Resultados expressos em número de células imunorreativas (% total)  $\pm$  erro padrão.



**Figura 6:** Figura representativa do padrão de marcação imunocitoquímica de culturas com anticorpos anti-TH (A, B, C), OX-42 (D, E, F) e anti-GFAP (G, H, I) e contra-coloração pelo método de Nissl. A marcação marrom representa imunocitoquímica revelada com DAB. Em violeta, ao fundo, coloração de Nissl. Escala = 50  $\mu$ m.





**Figura 7:** Figura representativa do padrão de marcação de culturas com anticorpo anti-MAP-2 (figuras à esquerda – imunofluorescência) e com o marcador nuclear DAPI (figuras à direita – fluorescência). Escala = 100 µm.

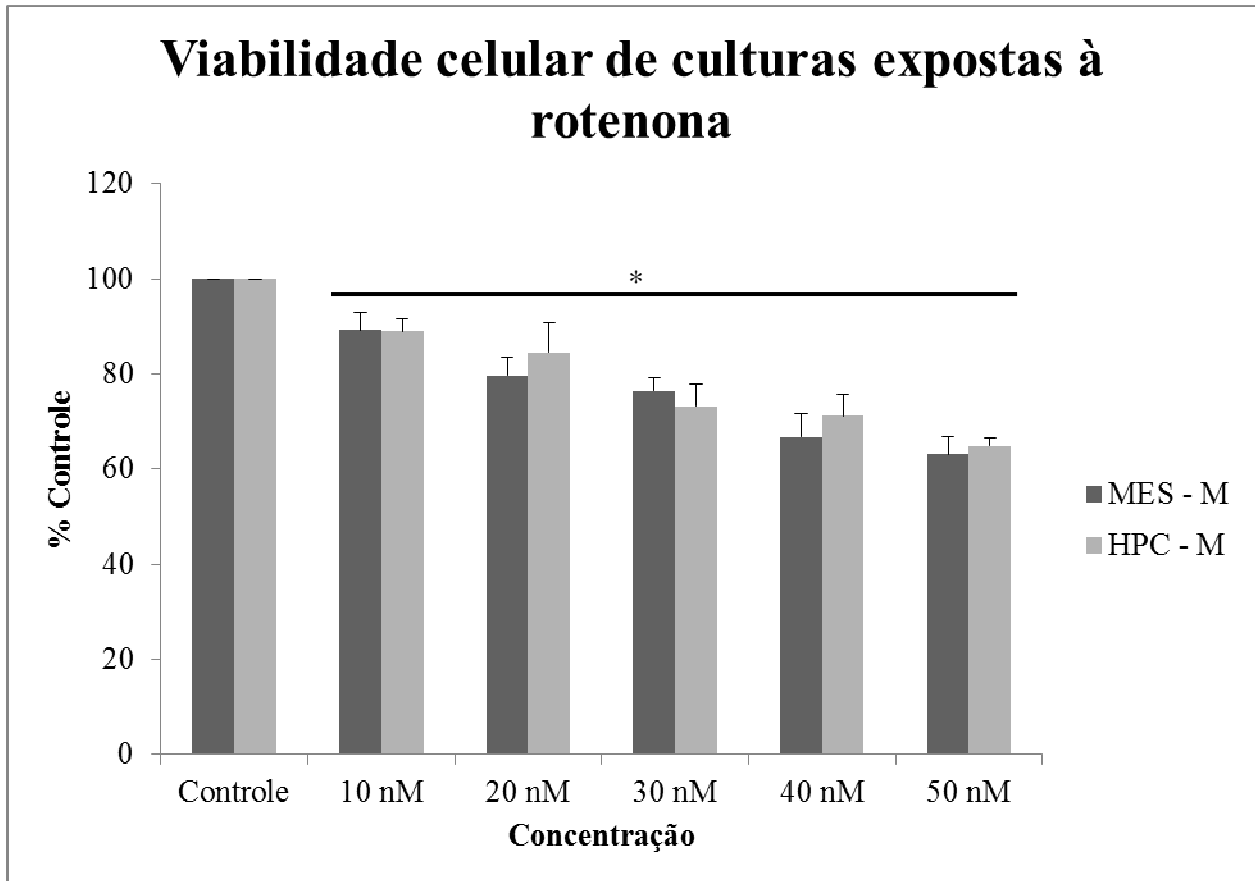
#### 4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAI PRIMÁRIAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL

Apesar de alguma controvérsia na literatura, a rotenona tem sido utilizada como um composto capaz de induzir degeneração seletiva de populações dopaminérgicas (Alam & Schmidt, 2004, 2002; Gao et al., 2003; Betarbet *et al.*, 2000), candidatando-se assim a gerar modelos experimentais ideais para o estudo dos mecanismos subjacentes à perda neuronal observada na doença de Parkinson. Para se avaliar possíveis diferenças regionais na viabilidade celular de culturas neuronais primárias mistas, foram utilizadas cinco concentrações de rotenona, 10, 20, 30, 40 e 50 nM, a fim de se verificar efeito dependente de dose deste composto sobre as células em cultura provenientes de hipocampo ou de mesencéfalo ventral.

As culturas mistas derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral apresentaram suscetibilidade semelhante à toxicidade da rotenona em todas as doses testadas. O ensaio de viabilidade celular mostrou que as culturas mistas derivadas de tecido hipocampal apresentaram valores de viabilidade celular de  $88,97 \pm 2,56 \%$ ,  $84,44 \pm 6,30 \%$ ,  $73,21 \pm 4,67 \%$ ,  $71,17 \pm 4,63 \%$  e  $64,89 \pm 1,56 \%$ , estatisticamente diferentes do grupo controle, para as concentrações crescentes citadas anteriormente (Figura 8; Tabela 4); enquanto que as culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade de  $89,23 \pm 3,56 \%$ ,  $79,62 \pm 3,78 \%$ ,  $76,41 \pm 2,89 \%$ ,  $66,78 \pm 4,89 \%$  e  $61,11 \pm 3,78 \%$  tratadas em concentrações crescentes de rotenona, estatisticamente diferentes em relação ao controle (Figura 8; Tabela 4).

**Tabela 4.** Viabilidade celular de culturas expostas à rotenona. Valores expressados em percentagem do controle  $\pm$  erro padrão. MES, mesencéfalo ventral; HPC, hipocampo.

	<b>Controle</b>	<b>10 nM</b>	<b>20 nM</b>	<b>30 nM</b>	<b>40 nM</b>	<b>50 nM</b>
<b>MES</b>	100	89,23 $\pm$ 3,56	79,62 $\pm$ 3,78	76,41 $\pm$ 2,89	66,78 $\pm$ 4,89	63,11 $\pm$ 3,78
<b>HPC</b>	100	88,97 $\pm$ 2,56	84,44 $\pm$ 6,30	73,21 $\pm$ 4,67	71,17 $\pm$ 4,63	64,89 $\pm$ 1,56



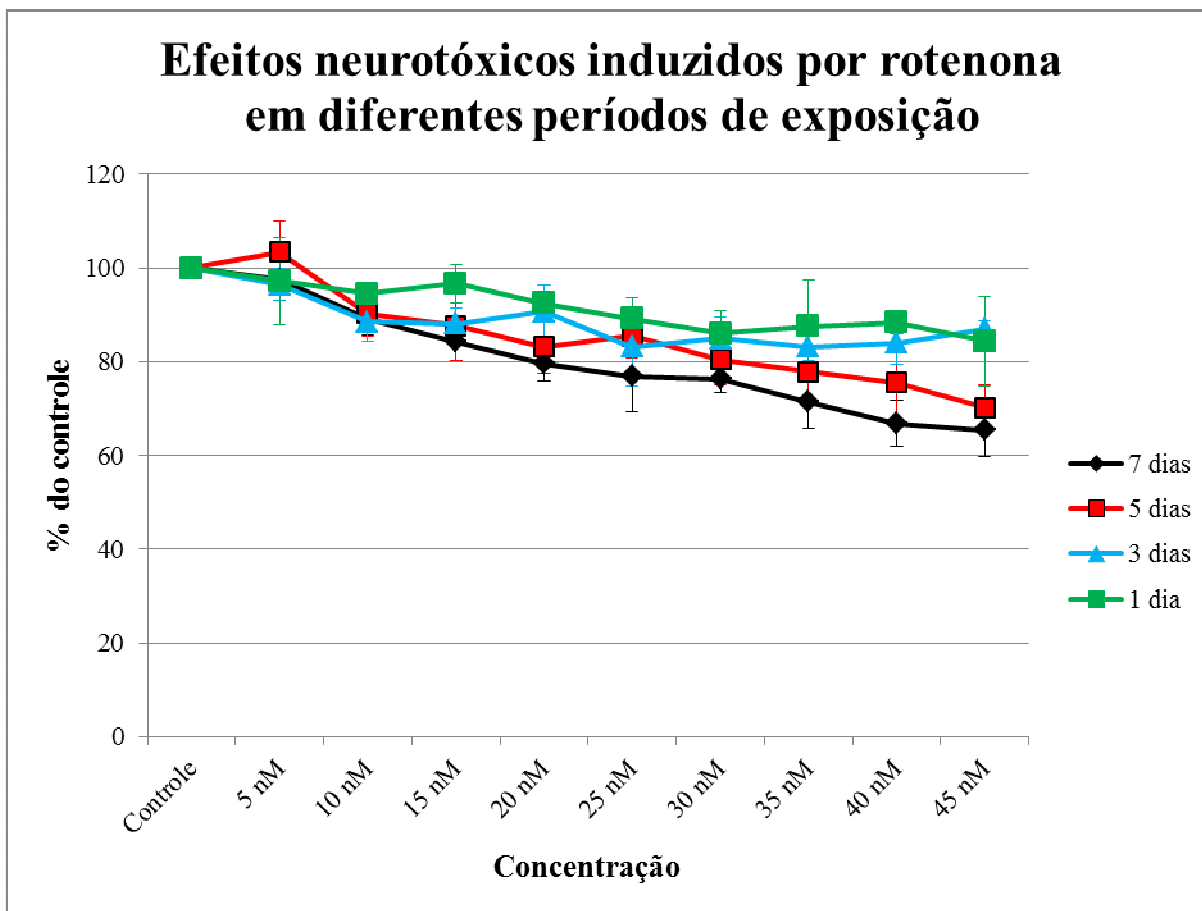
**Figura 8.** Viabilidade celular de culturas exposta à rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \* Valor de  $p < 0,05$ , considerado estatisticamente significativo em relação ao controle. MES-M, culturas mistas de mesencéfalo; HPC-M, culturas mistas de hipocampo.

#### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAIIS PRIMÁRIAS

Para se avaliar o efeito do tempo de exposição sobre a viabilidade celular de culturas neuronais mistas derivadas de mesencéfalo ventral, as culturas foram expostas a concentrações crescentes entre 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 nM de rotenona, por quatro períodos de tempo distintos. Verificou-se que houve uma tendência de redução da viabilidade celular das culturas expostas à rotenona em relação ao tempo de exposição (Figura 9, Tabela 5), embora este efeito não tenha se mostrado estatisticamente significativo em relação aos demais grupos (comparação intergrupos).

**Tabela 5.** Efeitos neurotóxicos induzidos por rotenona em diferentes períodos de exposição.

<i>Período de exposição</i>	<i>Controle</i>	<i>5 nM</i>	<i>10 nM</i>	<i>15 nM</i>	<i>20 nM</i>	<i>25 nM</i>	<i>30 nM</i>	<i>35 nM</i>	<i>40 nM</i>	<i>45 nM</i>
7 dias	100	97,56 ± 4,56	89,23 ± 3,56	84,26 ± 3,90	79,62 ± 3,78	76,94 ± 7,54	76,41 ± 2,89	71,46 ± 5,78	66,78 ± 4,89	65,42 ± 5,68
5 dias	100	103,45 ± 6,57	90,23 ± 4,87	87,65 ± 7,42	83,23 ± 5,67	85,45 ± 4,72	80,49 ± 5,46	77,82 ± 5,52	75,56 ± 8,89	70,24 ± 4,76
3 dias	100	96,43 ± 3,45	88,45 ± 3,98	88,05 ± 3,46	90,71 ± 5,61	83,25 ± 8,34	84,91 ± 4,57	83,21 ± 2,98	83,99 ± 4,67	86,99 ± 1,59
1 dia	100	97,23 ± 9,23	94,45 ± 1,99	96,64 ± 4,11	92,46 ± 1,90	89,13 ± 4,44	86,02 ± 4,90	87,54 ± 9,94	88,43 ± 2,38	84,36 ± 9,49



**Figura 9.** Viabilidade celular de culturas exposta à rotenona por diferentes períodos de tempo. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4. O ENVOLVIMENTO DOS ÍONS CÁLCIO NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA.

Foram utilizadas as seguintes drogas que interferem na homeostase do cálcio: tapsigargina, um inibidor da bomba de cálcio microsomal; benzamil, inibidor do trocador  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  da membrana celular; EDTA, um quelante de cálcio extracelular; nifedipina, bloqueador de canais de cálcio dependentes de voltagem tipo L da membrana celular; e vermelho de rutênio, bloqueador do transportador uniporte mitocondrial de cálcio.

Para analisar o efeito do cálcio sobre a toxicidade da rotenona, utilizamos a concentração de 20nM de rotenona (Rot) em todos os experimentos, pois é uma concentração que, de acordo com resultados prévios, promove redução da viabilidade celular estatisticamente significativa.

Os experimentos com Tapsigargina (Tg) administrada de maneira concomitante com a rotenona resultaram em valores de degeneração similares aos observados com administração isolada de rotenona: os grupos tratados com 20nM Rot, 3 $\mu\text{M}$  e 5 $\mu\text{M}$  de Tg, 20nM Rot + 1 $\mu\text{M}$  Tg, 20nM Rot + 3 $\mu\text{M}$  Tg e 20nM de Rot + 5 $\mu\text{M}$  Tg apresentaram viabilidade celular de  $67,39 \pm 5,02 \%$ ,  $42,50 \pm 3,39 \%$ ,  $40,60 \pm 3,28 \%$ ,  $51,93 \pm 6,20 \%$ ,  $45,52 \pm 1,89 \%$  e  $46,50 \pm 6,15 \%$ , respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 10, Tabela 6).

Analisando os resultados, verificou-se que a Tapsigargina não apresentou efeito protetor contra a toxicidade induzida por rotenona; ao contrário, as culturas expostas à Tapsigargina, com ou sem exposição concomitante à rotenona, apresentaram viabilidade celular significativamente menor que o grupo exposto apenas à rotenona.

A exposição das culturas a este paradigma de tratamento apresentou valores de viabilidade celular de  $67,39 \pm 5,02 \%$ ,  $42,50 \pm 3,39 \%$ ,  $40,60 \pm 3,28 \%$ ,  $51,93 \pm 6,20 \%$ ,  $45,52 \pm$



1,89 % e  $46,50 \pm 6,15$ , para os grupos ROT 20 nM, Tg 3 $\mu$ M, Tg 5  $\mu$ M, Rot + Tg 1  $\mu$ M, Rot + Tg 3  $\mu$ M e Rot + Tg 5  $\mu$ M, respectivamente.

Os experimentos com Benzamil (Benz) apresentaram os seguintes resultados: os grupos tratados com 20nM Rot, 10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M de Benz, 20nM Rot + 5 $\mu$ M Benz, 20nM Rot + 10 $\mu$ M Benz e 20nM de Rot + 20 $\mu$ M Benz apresentaram viabilidade celular de  $66,20 \pm 3,49$  %,  $68,48 \pm 2,95$  %,  $62,39 \pm 5,21$  %,  $62,75 \pm 3,38$  %,  $64,86 \pm 3,36$  % e  $53,17 \pm 4,12$  %, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 11, Tabela 7).

A análise dos resultados mostrou que o Benzamil não apresentou efeito protetor contra a toxicidade induzida por rotenona, à exceção do grupo ROT + BENZ 20  $\mu$ M, que apresentou viabilidade celular inferior ao grupo ROT 20 nM, estatisticamente diferente; os demais grupos não se mostraram estatisticamente diferentes do grupo ROT 20  $\mu$ M.

Os experimentos com EDTA apresentaram os seguintes resultados: os grupos tratados com 20 nM Rot, 0,5 mM e 1 mM de EDTA, 20 nM Rot + 0,5 mM EDTA e 20 nM Rot + 1 mM EDTA apresentaram viabilidade celular de  $78,50 \pm 4,32$  %,  $68,42 \pm 2,78$  %,  $69,61 \pm 7,41$  %,  $74,9 \pm 3,10$  % e  $64,79 \pm 2,78$  %, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 12, Tabela 8).

A análise dos resultados mostrou que o EDTA não apresentou efeito protetor contra a toxicidade induzida por rotenona, à exceção do grupo ROT + 1 mM EDTA, que apresentou viabilidade celular inferior ao grupo ROT 20 nM, estatisticamente diferente; os demais grupos não se mostraram estatisticamente diferentes do grupo ROT 20 nM.

Os experimentos com Nifedipina (Nif) apresentaram os seguintes resultados: os grupos tratados com 20nM Rot, 0,1mM e 1mM de Nif, 20nM Rot + 0,1mM Nif, 20nM Rot + 0,5mM Nif e 20nM de Rot + 1mM Nif apresentaram viabilidade celular de  $80,12 \pm 5,49$  %,  $78,50 \pm 4,32$  %,  $68,42 \pm 2,78$  %,  $69,61 \pm 7,41$  %,  $74,9 \pm 3,10$  % e  $64,79 \pm 2,78$  %, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 13, Tabela 9).

85,30 ± 5,15 %, 68,70 ± 6,32 %, 83,06 ± 3,78 %, 74,92 ± 8,52 % e 69,11 ± 4,67%, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 13, Tabela 9).

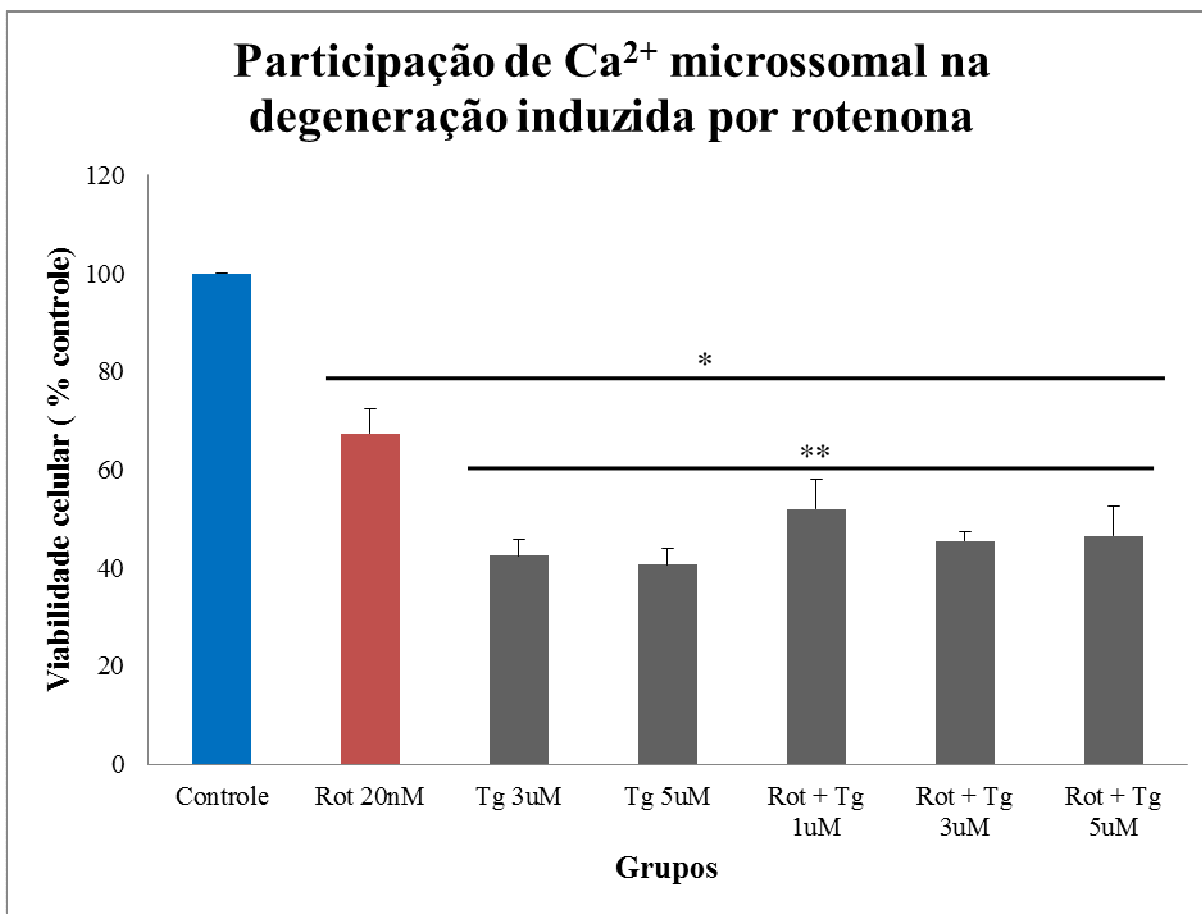
A análise dos resultados mostrou que a Nifedipina não apresentou efeito protetor estatisticamente diferente contra a toxicidade induzida por rotenona (grupo ROT 20 nM).

Os experimentos com Vermelho de rutênio (VR) apresentaram os seguintes resultados: os grupos tratados com 20nM Rot, 0,5µM e 3µM de VR, 20nM Rot + 0,5µM VR, 20nM Rot + 1µM VR e 20nM de Rot + 3µM VR apresentaram viabilidade celular de 77,46 ± 3,60 %, 102,51 ± 2,50 %, 87,37 ± 4,80 %, 86,55 ± 3,13 %, 91,94 ± 1,94 % e 75,47 ± 5,98 %, respectivamente, em relação ao grupo controle (100%) (Figura 14, Tabela 10).

A análise estatística dos dados mostrou que os grupos expostos ao Vermelho de Rutênio, com ou sem exposição à rotenona apresentaram viabilidade celular ligeiramente maior que o grupo tratado apenas com Rotenona, porém, sem apresentar diferença estatística, à exceção do grupo ROT + 1µM VR, que apresentou diferença em relação ao grupo tratado apenas com Rotenona.

**Tabela 6.** Efeito da Tapsigargina sobre a viabilidade celular de culturas expostas à rotenona. Valores expressos em percentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

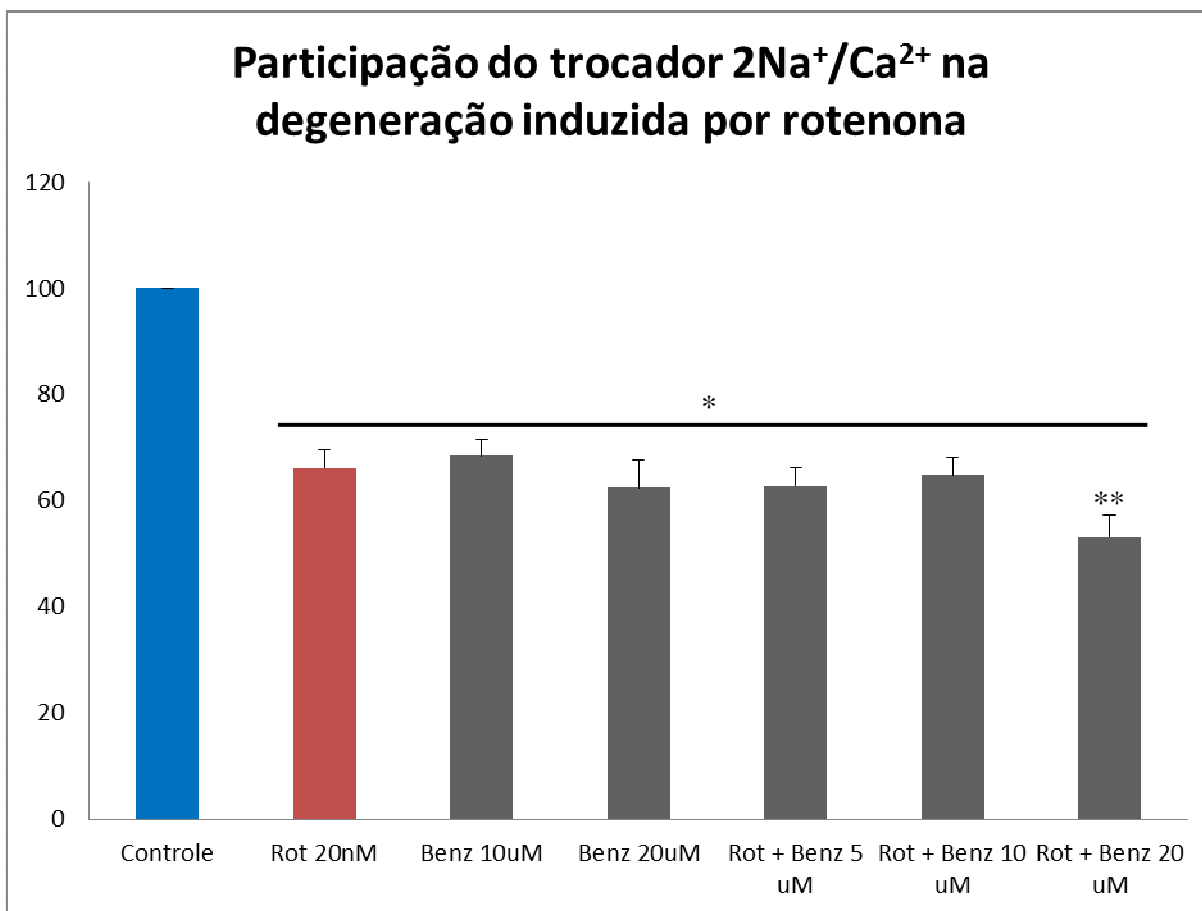
<b>Grupo</b>	<b>Controle</b>	<b>Rot 20 nM</b>	<b>Tg 3 <math>\mu</math>M</b>	<b>Tg 5 <math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Tg 1 <math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Tg 3 <math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Tg 5 <math>\mu</math>M</b>
<b>Resultado</b>	100	67,39 $\pm$ 5,02	42,50 $\pm$ 3,39	40,60 $\pm$ 3,28	51,93 $\pm$ 6,20	45,52 $\pm$ 1,89	46,50 $\pm$ 6,15



**Figura 10.** Participação do  $\text{Ca}^{2+}$  microsossomal na degeneração celular induzida por rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*, Valores estatisticamente diferentes do grupo ROT 20 nM ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Efeito do Benzamil sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

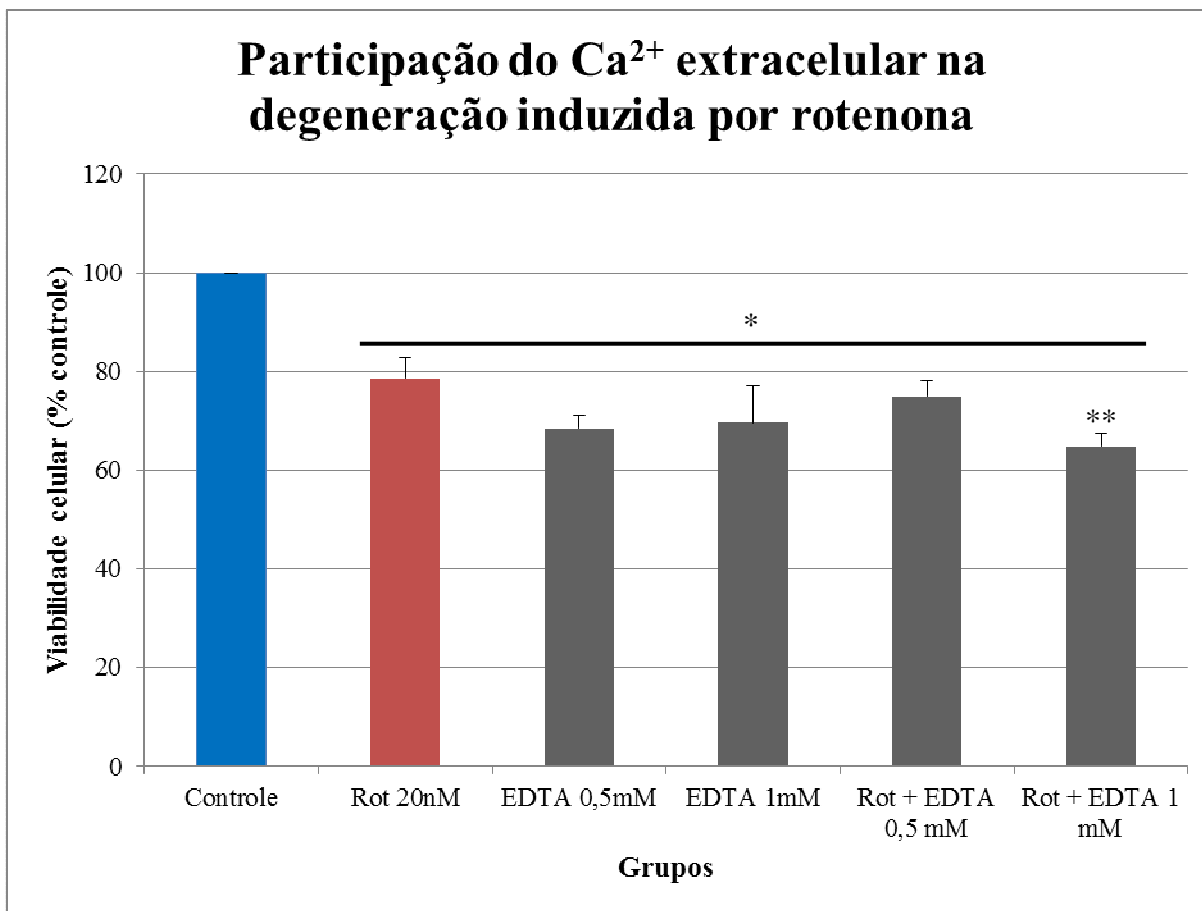
<b>Grupo</b>	<b>Controle</b>	<b>Rot 20nm</b>	<b>Benz 10<math>\mu</math>M</b>	<b>Benz 20<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Benz 5<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Benz 10<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + Benz 20<math>\mu</math>M</b>
<b>Resultados</b>	100	66,20 $\pm$ 3,49	68,48 $\pm$ 2,95	62,39 $\pm$ 5,21	62,75 $\pm$ 3,38	64,86 $\pm$ 3,36	53,17 $\pm$ 4,12



**Figura 11.** Participação do trocador  $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  na degeneração celular induzida por rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*, Valores estatisticamente diferentes do grupo ROT 20 nM ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8:** Efeito do EDTA sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

Grupos	Controle	Rot 20nM	EDTA 0,5 mM	EDTA 1mM	Rot + EDTA 0,5mM	Rot + EDTA 1mM
Resultados	100,0	78,50 $\pm$ 4,32	68,42 $\pm$ 2,95	69,61 $\pm$ 7,41	74,96 $\pm$ 3,10	64,79 $\pm$ 2,78

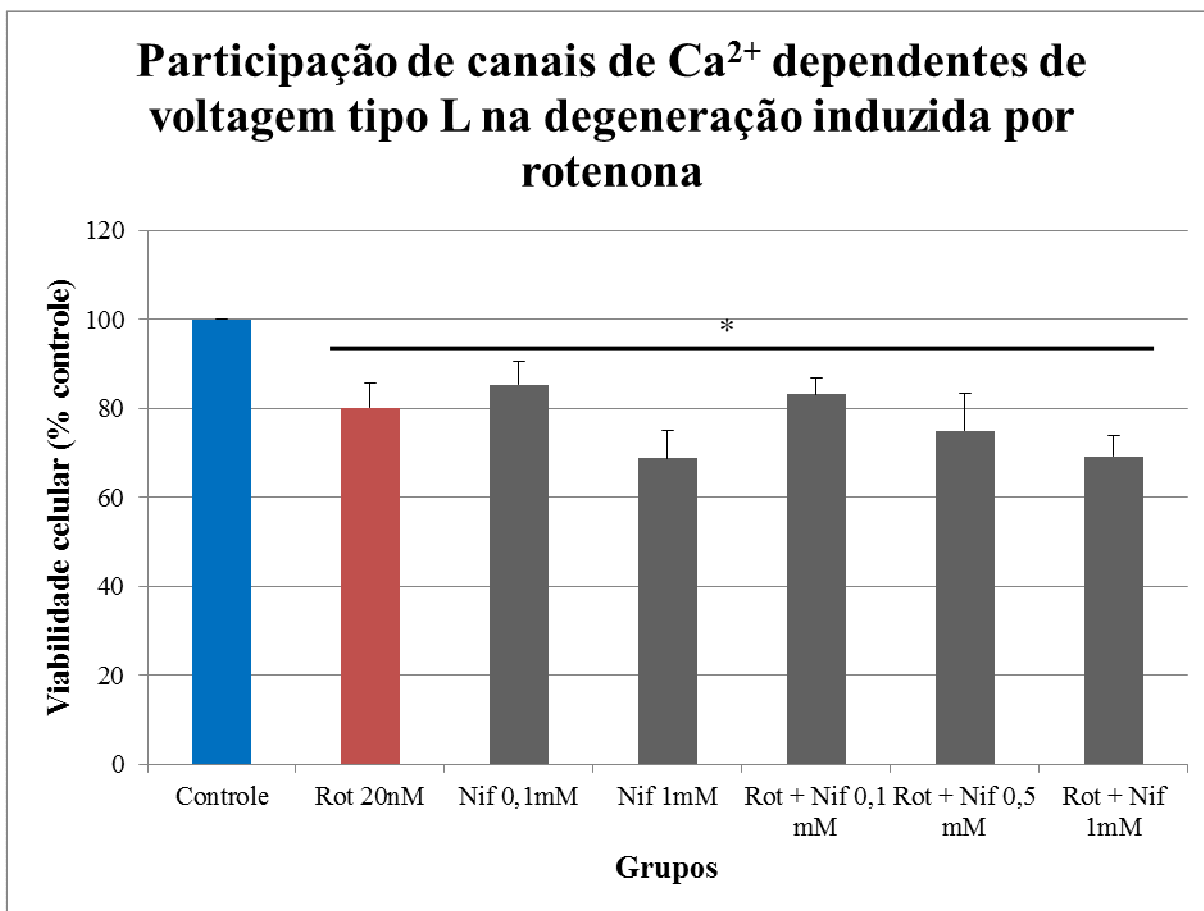


**Figura 12.** Participação do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular na degeneração celular induzida por rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*, Valores estatisticamente diferentes do grupo ROT 20 nM ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 9.** Efeito da Nifedipina sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

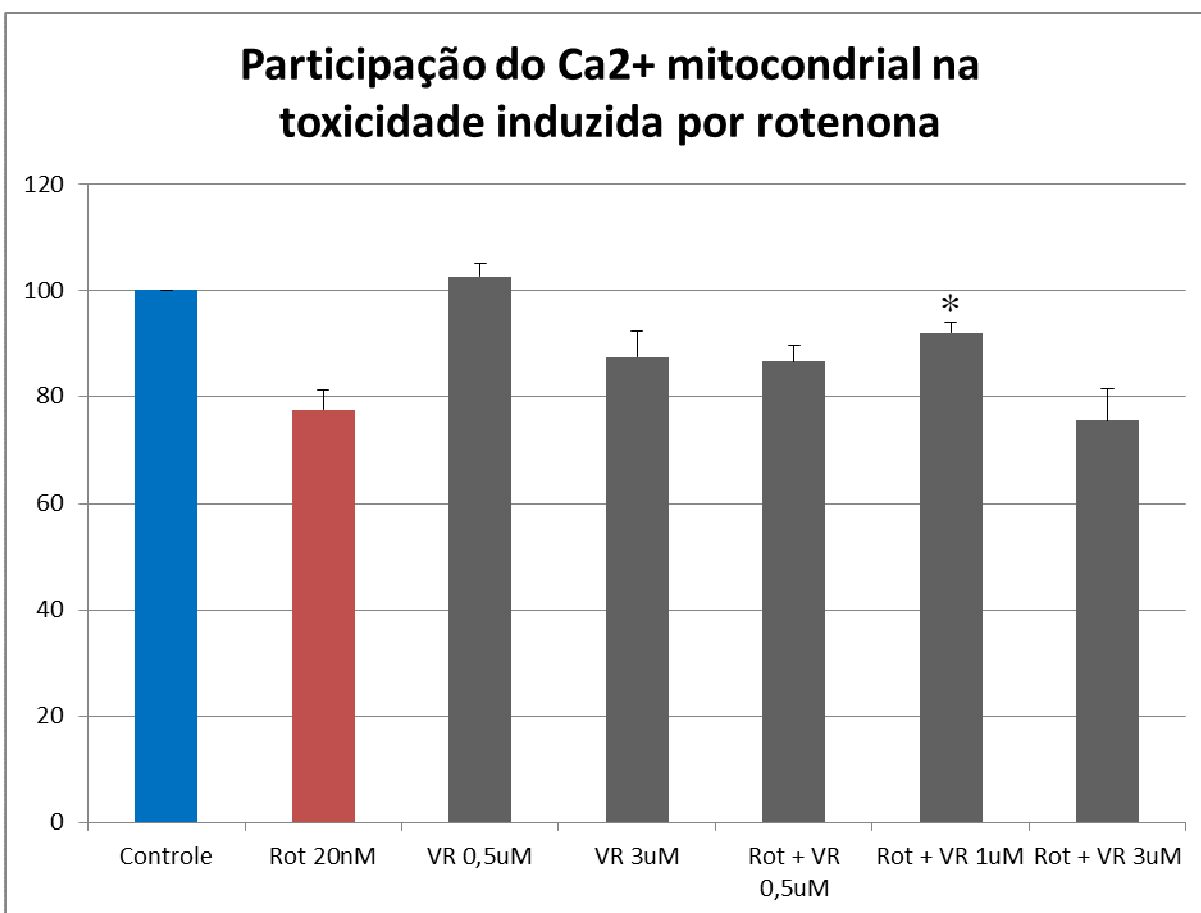
<b>Grupos</b>	<b>Controle</b>	<b>Rot 20nM</b>	<b>Nif 0,1 mM</b>	<b>Nif 1mM</b>	<b>Rot + Nif 0,1mM</b>	<b>Rot + Nif 0,5mM</b>	<b>Rot + Nif 1mM</b>
<b>Resultados</b>	100	80,10 $\pm$ 5,49	85,30 $\pm$ 5,15	68,70 $\pm$ 6,32	83,06 $\pm$ 3,78	74,92 $\pm$ 852	69,10 $\pm$ 4,67



**Figura 13.** Participação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem tipo L na degeneração celular induzida por rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ); \*\*, Valores estatisticamente diferentes do grupo ROT 20 nM ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 5:** Efeito do Vermelho de Rutênio sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

<b>Grupos</b>	<b>Controle</b>	<b>Rot 20nM</b>	<b>VR 0,5 <math>\mu</math>M</b>	<b>VR 3<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + VR 0,5<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + VR 1<math>\mu</math>M</b>	<b>Rot + VR 3<math>\mu</math>M</b>
<b>Resultados</b>	100	77,46 $\pm$ 3,60	102,51 $\pm$ 2,50	87,37 $\pm$ 4,80	86,55 $\pm$ 3,13	91,94 $\pm$ 1,94	75,47 $\pm$ 5,98



**Figura 14.** Participação do Ca<sup>2+</sup> mitocondrial na degeneração celular induzida por rotenona. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO *Swietenia macrophylla* SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA

Muito embora radicais livres sejam importantes na função celular normal, o estresse oxidativo causado pela sua produção excessiva tem sido implicado em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo-se a doença de Parkinson (Surmeier *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2011). Acredita-se que compostos polifenólicos têm potencial como moléculas capazes de sequestrar radicais livres, e têm despertado interesse crescente nos últimos anos, especialmente em função de seu potencial protetor e potencial terapêutico em doenças degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo (Bixby *et al.*, 2005; Havsteen, 2002).

O estudo a respeito de folhas de *S. macrophylla*, potencialmente rico em polifenóis, pode levar a descoberta de novas fontes de agentes antioxidantes, inclusive promovendo incentivo à preservação destas espécies de plantas. Falah e colaboradores (2008), por exemplo, reportou potente atividade antioxidante relacionada à catequina e epicatequina isolada de casca de *S. macrophylla*.

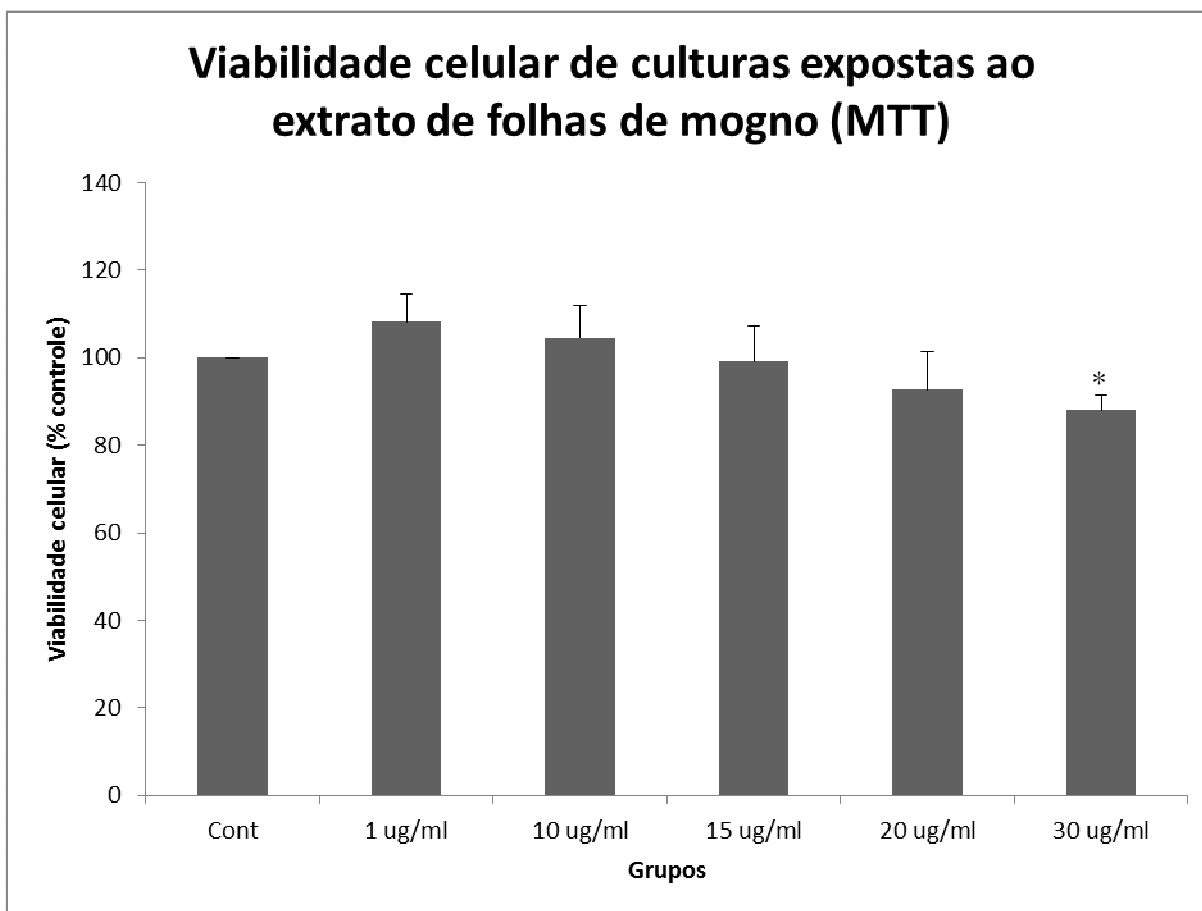
A fim de analisar se a utilização do extrato aquoso obtido a partir de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*), com composição rica em polifenóis com poder antioxidante, confere proteção contra os efeitos tóxicos da rotenona, caso tais efeitos estejam relacionados com indução de estresse oxidativo, culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral foram tratadas com rotenona e/ou extrato de mogno.

Para isso, primeiro se fez uma curva de toxicidade para o extrato aquoso obtido a partir de folhas de mogno a ser utilizado, utilizando-se os métodos de MTT e LDH. As concentrações do extrato de mogno utilizadas foram 1, 10, 15, 20 e 30 µg/mL.

A exposição de culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral ao extrato aquoso de folhas de mogno resultou em valores de viabilidade celular de  $108,14 \pm 6,45 \%$ ,  $104,55 \pm 7,34$ ,  $99,07 \pm 8,12 \%$ ,  $92,65 \pm 8,71 \%$  e  $88,05 \pm 3,39 \%$ , comparados ao controle (100%), através do método do MTT. Nas concentrações testadas, apenas a concentração de 30 ug/mL apresentou efeito tóxico estatisticamente significativo. As demais concentrações não apresentaram alteração significativa na viabilidade celular, quando comparadas ao controle (Figura 15, Tabela 11).

**Tabela11** : Efeito do Extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas (método do MTT). Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

<b>Grupos</b>	<b>Controle</b>	<b>1 ug/mL</b>	<b>10 ug/mL</b>	<b>15 ug/mL</b>	<b>20 ug/mL</b>	<b>30 ug/mL</b>
<b>Resultados</b>	100	108,14 $\pm$ 6,45	104,55 $\pm$ 7,34	99,07 $\pm$ 8,12	92,65 $\pm$ 8,71	88,05 $\pm$ 3,39



**Figura 15.** Padronização da curva de toxicidade do extrato aquoso de folhas de mogno. Valores expressos em % do grupo controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ).



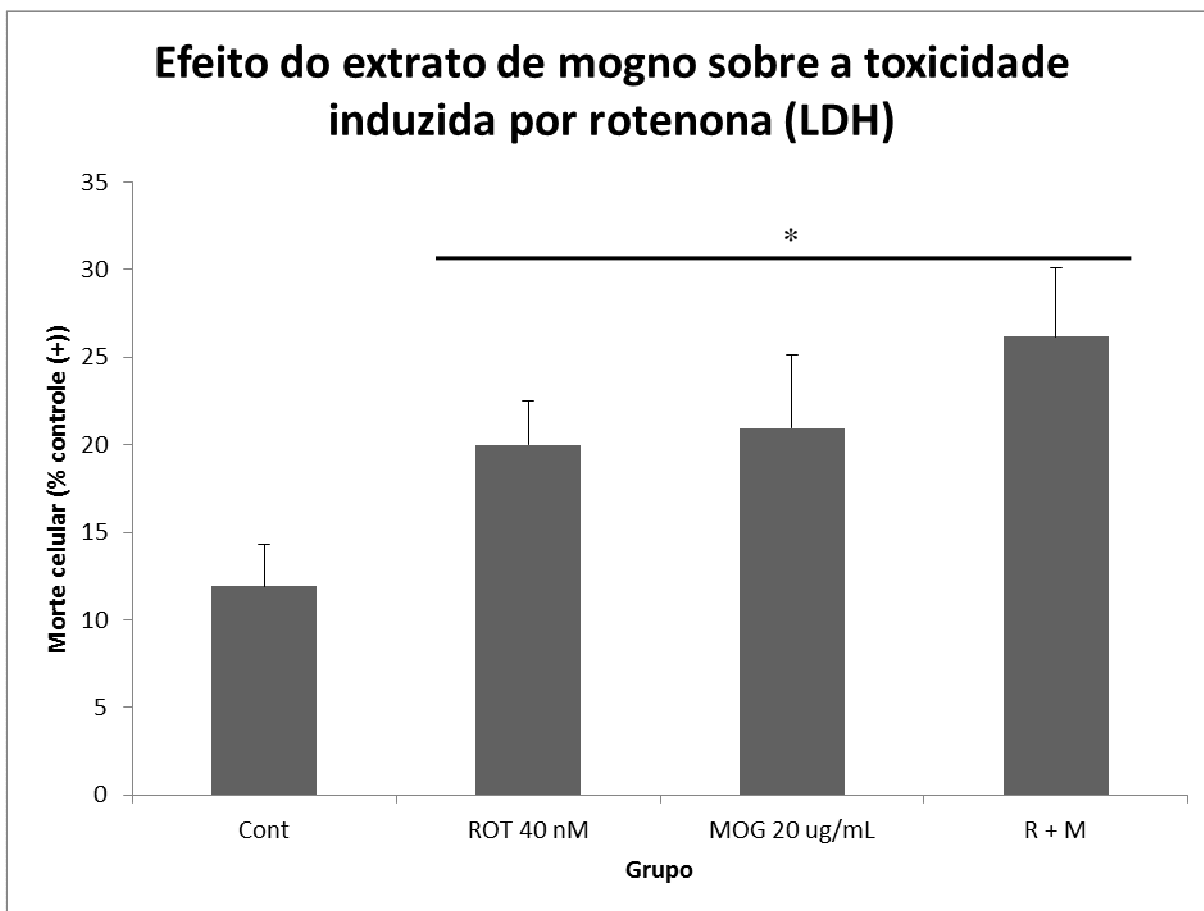
Em seguida, realizou-se exposição de culturas à rotenona e ao extrato aquoso de folhas de mogno, concomitantemente, por sete dias *in vitro*, a fim de se verificar possíveis efeitos protetores contra a toxicidade induzida por rotenona. Nestes experimentos, foram utilizados os seguintes paradigmas de tratamento: grupo Controle, grupo tratado com Rotenona 40 nM, grupo Mogno 20 ug/mL e grupo Rotenona 20 nM + Mogno 20 ug/mL. Nestes experimentos, utilizou-se uma dose mais elevada de rotenona a fim de se obter maior efeito tóxico medido através do método do LDH e, assim, melhor avaliar os possíveis efeitos protetores do extrato aquoso de folhas de mogno.

Verificou-se que a concentração do extrato aquoso de folhas de mogno escolhida não apresentou efeito protetor contra a toxicidade induzida por rotenona; adicionalmente, a associação de Rotenona 40 nM + Mogno 20 ug/mL mostrou-se mais tóxica para as culturas testadas que a exposição apenas à Rotenona 40 nM.

Os experimentos com a técnica de LDH apresentaram os seguintes valores de morte celular:  $11,93 \pm 2,36 \%$ ,  $19,98 \pm 2,49 \%$ ,  $20,92 \pm 4,21 \%$ ,  $26,16 \pm 3,90 \%$ , para os grupos Controle, Rotenona 40 nM, Mogno 20 ug/mL e Rotenona 40 nM + Mogno 20ug/mL, respectivamente (Figura 16, Tabela 12).

**Tabela 12:** Efeito do Extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas expostas á rotenona (método do LDH). Valores expressos em porcentagem do controle (+)  $\pm$  erro padrão.

<b>Grupos</b>	<b>C (+)</b>	<b>Controle</b>	<b>Rotenona 40 nM</b>	<b>Mogno 20 ug/mL</b>	<b>ROT + MOG</b>
<b>Resultados</b>	100	11,93 $\pm$ 2,36	19,98 $\pm$ 2,49	20,92 $\pm$ 4,21	26,16 $\pm$ 3,90



**Figura 16.** Efeito do Extrato aquoso de folhas de mogno sobre a viabilidade celular de culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona (método do LDH). Valores expressos em porcentagem do controle (+)  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo Controle (+) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CULTURAS PRIMÁRIAS MESENCEFÁLICAS EXPOSTAS À ROTENONA

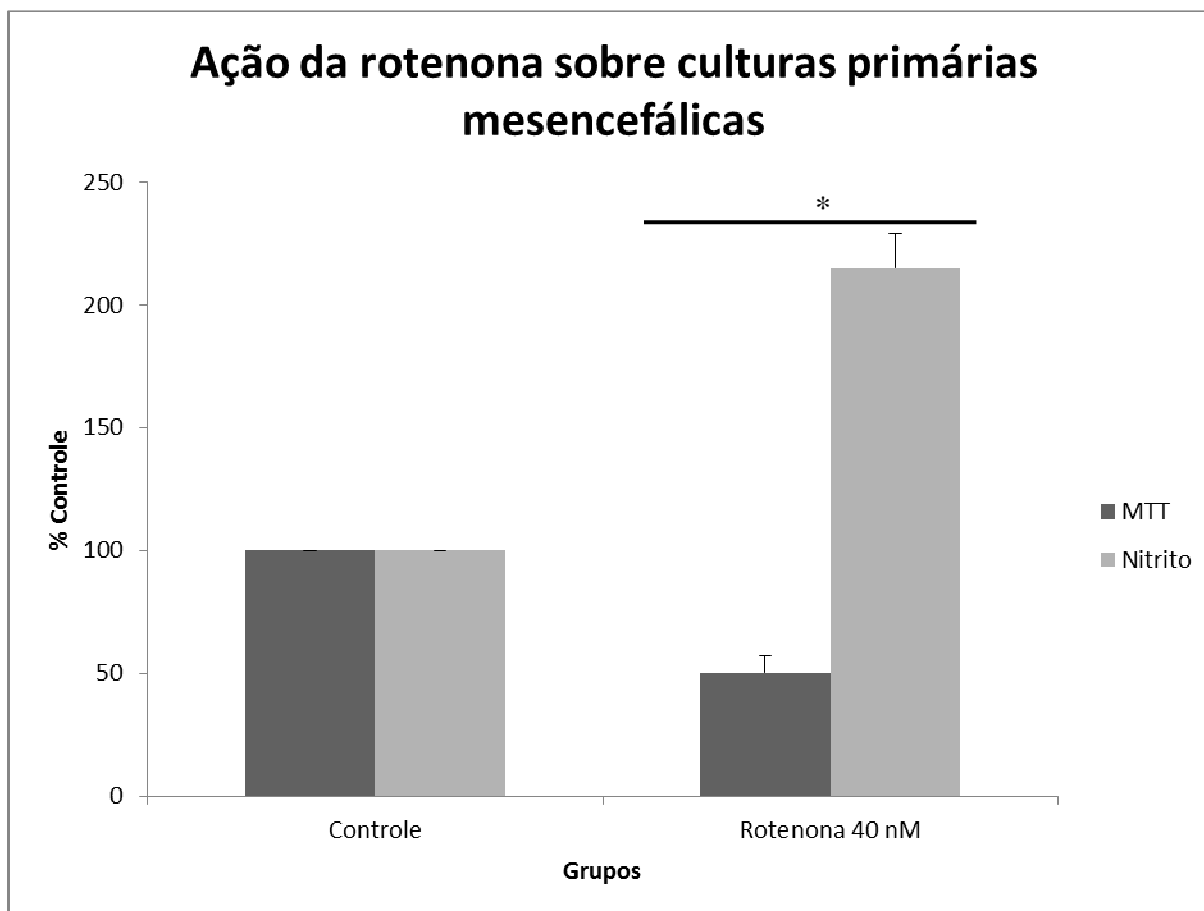
A fim de investigar se durante a exposição das culturas primárias mistas mesencefálicas à rotenona ocorre estresse nitrérgico decorrente de produção excessiva de óxido nítrico, foi feita análise dos níveis de nitrito a partir de sobrenadante das culturas utilizadas no modelo experimental utilizado no trabalho. Para isso, utilizamos uma concentração maior de rotenona devido à concentração utilizada até então no trabalho não ter apresentado níveis de nitrito quantificáveis pelo método do reagente de Griess.

Além disso, utilizamos dois métodos de cultura para se testar a ocorrência de estresse oxidativo: culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral e culturas organotípicas de estriado e mesencéfalo ventral. A utilização do segundo protocolo de cultura se deveu a necessidade de se avaliar a produção contínua de NO durante a exposição ao longo do tempo de cultura, haja vista que culturas organotípicas sobrevivem por período maior que as culturas primárias.

Os resultados para a avaliação da viabilidade celular, através da análise do MTT, mostraram que culturas tratadas com Rotenona (40 nM) durante sete dias apresentaram viabilidade celular de  $50,29 \pm 6,59 \%$ , em relação ao controle. Para o mesmo paradigma de tratamento, a análise do sobrenadante pelo método do Reagente de Griess apresentou níveis de nitrito de  $214,93 \pm 14,03 \%$ , comparado ao controle, indicando forte aumento na produção de NO induzido pela rotenona, nestas condições experimentais (Figura 17, Tabela 13)

**Tabela 13:** Análise da produção de nitrito (Reagente de Griess) e da viabilidade celular (MTT) sobre culturas mesencefálicas mistas expostas á rotenona e extrato de mogno. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

<b>Grupos</b>	<b>C (+)</b>	<b>MTT</b>	<b>Griess</b>
<b>Resultados</b>	100	50,29 $\pm$ 6,59	214,93 $\pm$ 14,03



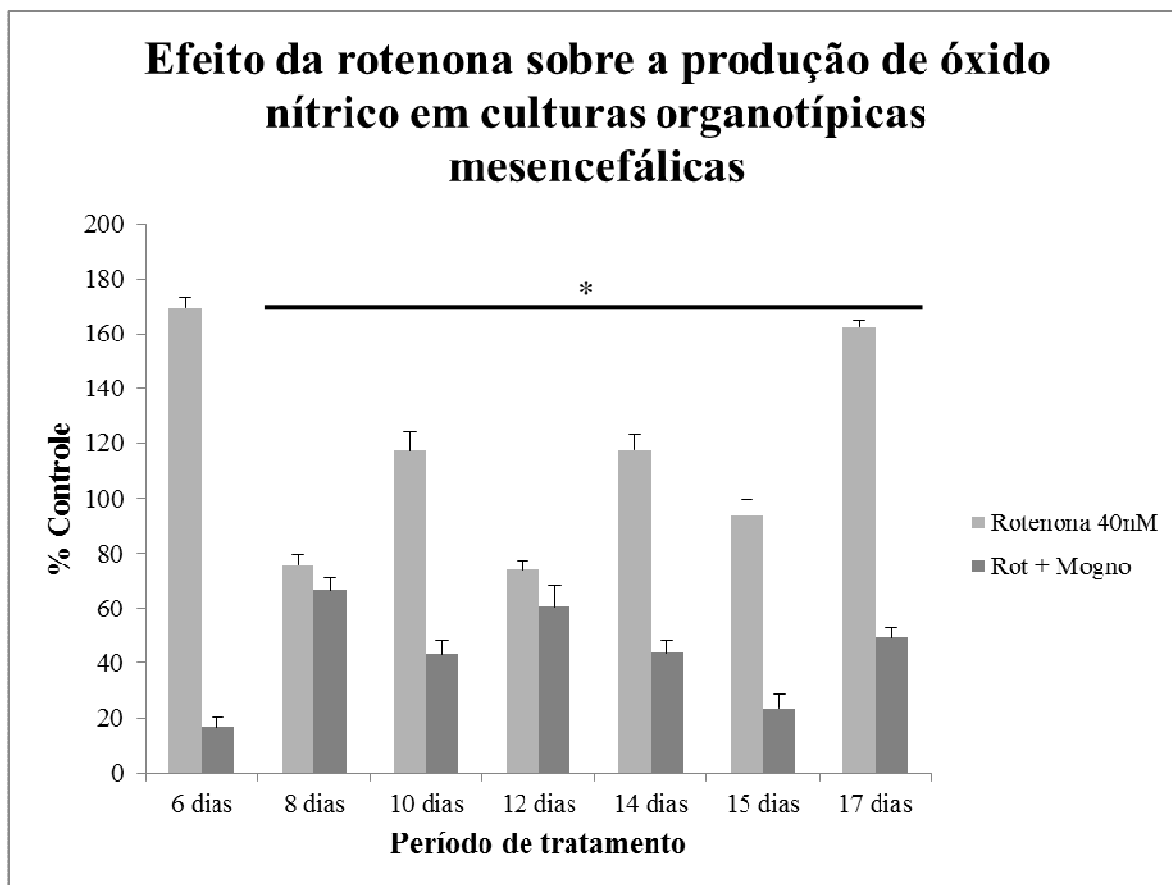
**Figura 17:** Análise da produção de nitrito induzido por rotenona em culturas mesencefálicas. Resultados para análise da viabilidade celular (MTT) e dosagem de nitrito (Reagente de Griess). Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

A avaliação do efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a produção de nitrito induzida por rotenona foi feita através do Reagente de Griess, utilizando o sobrenadante das culturas a cada troca de meio de cultura. Verificou-se menor produção de nitrito em culturas expostas à rotenona e mogno, concomitantemente, quando comparadas ao grupo exposto apenas à rotenona, apresentando valores de  $169,31 \pm 3,69 \%$ ,  $75,40 \pm 4,18 \%$ ,  $117,45 \pm 6,53 \%$ ,  $73,86 \pm 3,68 \%$ ,  $117,51 \pm 5,60 \%$ ,  $94,03 \pm 5,41 \%$  e  $162,50 \pm 2,60 \%$ , para o grupo tratado com 40 nM de rotenona, após 6, 8, 10, 12, 14, 15 e 17 dias de tratamento, respectivamente; para o grupos exposto aos dois compostos, verificou-se níveis de  $16,67 \pm 3,47 \%$ ,  $66,60 \pm 4,37 \%$ ,  $43,08 \pm 5,11 \%$ ,  $60,60 \pm 7,63 \%$ ,  $43,83 \pm 4,56 \%$ ,  $23,25 \pm 5,67 \%$  e  $49,44 \pm 3,29 \%$ , para o grupo tratado com rotenona e mogno, após 6, 8, 10, 12, 14, 15 e 17 dias de tratamento, respectivamente (Figura 18, Tabela 14).

**Tabela 14:** Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a produção de nitrito (Reagente de Griess) em culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão.

	<b>Período <i>in vitro</i> (dias)</b>						
	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>17</b>
<b>Controle</b>	100	100	100	100	100	100	100
<b>ROT 40 nM</b>	169,31 $\pm$ 3,69	75,40 $\pm$ 4,18	117,45 $\pm$ 6,53	73,86 $\pm$ 3,68	117,51 $\pm$ 5,60	94,03 $\pm$ 5,41	162,50 $\pm$ 2,60
<b>ROT + MOG 20 ug/mL</b>	16,67 $\pm$ 3,47	66,60 $\pm$ 4,37	43,08 $\pm$ 5,11	60,60 $\pm$ 7,63	43,83 $\pm$ 4,56	23,25 $\pm$ 5,67	49,44 $\pm$ 3,29





**Figura 18:** Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno sobre a produção de nitrito (Reagente de Griess) em culturas mesencefálicas mistas expostas à rotenona. Valores expressos em porcentagem do controle  $\pm$  erro padrão. \*, Valores estatisticamente diferentes do grupo Controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR NO MODELO *IN VITRO* DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

A fim de avaliar se a redução na viabilidade celular ocorre através de indução de morte celular por necrose e/ou apoptose, foi feita análise quantitativa por Western blotting para expressão e clivagem de espectrina, proteína que, em eventos de morte celular, é clivada gerando fragmentos peptídicos de caspase ou calpaína, servindo como indicador de morte celular por apoptose ou necrose, respectivamente.

A avaliação dos resultados foi feita através da densidade óptica das bandas geradas e posterior cálculo da relação da proteína a ser quantificada com o controle positivo (beta-actina ou beta-tubulina), obtendo-se a razão que pode indicar alteração na expressão da proteína espectrina, bem como seus produtos pós-clivagem.

Para isso, as culturas foram divididas em quatro grupos: Controle, Rotenona 40 nM, Mogno 20 ug/mL e Rotenona + Mogno.

O cálculo da razão Banda 1 (espectrina)/Beta-actina apresentou valores de 0,21, 0,73, 2,69 e 3,08 para os grupos Controle, Rotenona 40 nM, Mogno 20 ug/mL e Rotenona + Mogno, respectivamente. Tais resultados mostraram aumento na expressão de espectrina nos três grupos tratados em comparação ao controle; ainda, os grupos tratados apenas com Mogno e Rotenona + Mogno apresentaram níveis de expressão bem superiores ao grupo tratado apenas com Rotenona, sugerindo que o composto antioxidante, na concentração testada, não conferiu proteção contra os efeitos tóxicos da Rotenona, promovendo, na verdade, aumento na toxicidade para as culturas testadas.

O cálculo da razão Banda 2 (calpaína)/Beta-actina apresentou valores de 0,99, 0,82, 1,60 e 1,84 para os grupos Controle, Rotenona 40 nM, Mogno 20 ug/mL e Rotenona

+ Mogno, respectivamente. Tais resultados mostraram aumento na expressão de calpaína nos grupos tratados apenas com Mogno e Rotenona + Mogno, em relação ao controle, sugerindo que o composto antioxidante, na concentração testada, não conferiu proteção contra os efeitos tóxicos da Rotenona, promovendo aumento na toxicidade para as culturas testadas.

O cálculo da razão Banda 3 (caspase)/Beta-actina apresentou valores de 0,26, 0,45, 1,00 e 1,04 para os grupos Controle, Rotenona 40 nM, Mogno 20 ug/mL e Rotenona + Mogno, respectivamente. Tais resultados mostraram aumento na expressão de caspase nos três grupos tratados em comparação ao controle; ainda, os grupos tratados apenas com Mogno e Rotenona + Mogno apresentaram níveis de expressão bem superiores ao grupo tratado apenas com Rotenona, sugerindo que o composto antioxidante, na concentração testada, não conferiu proteção contra os efeitos tóxicos da Rotenona, promovendo, aumento na toxicidade para as culturas testadas (Tabela 15).

Os valores das razões entre as três bandas com a beta-tubulina também apresentaram mesmo comportamento, com aumento nos níveis de expressão para as três proteínas testadas, além de este aumento ser mais evidente nos grupos Mogno e Rotenona + Mogno (dados não mostrados)

**Tabela 15.** Análise da expressão das proteínas espectrina, calpaína e caspase de culturas primárias mistas mesencefálicas. Resultados quantitativos de Western blotting através de densidade óptica. Resultados expressos através da razão da proteína alvo/ proteína beta-actina.

	<b>Controle</b>	<b>Rotenona 40 nM</b>	<b>Mogno 20 ug/mL</b>	<b>ROT + MOG</b>
<b>B1/b-actina</b>	0,21	0,73	2,69	3,08
<b>B2/b-actina</b>	0,99	0,82	1,60	1,84
<b>B3/b-actina</b>	0,26	0,45	1,00	1,04

## 5. DISCUSSÃO

Este trabalho se baseia no êxito recente em se demonstrar efeitos degenerativos de diversos pesticidas sobre o sistema nigroestriatal dopaminérgico em animais experimentais, como fundamento para se investigar mecanismos celulares subjacentes à etiologia da DP. Assim, depois que Betarbet et al. (2000) reportaram que a administração crônica de rotenona, um composto muito utilizado como herbicida em diversos países e como piscicida na Amazônia brasileira, resultou em destruição seletiva de células dopaminérgicas da SNpc, formação de inclusões citoplasmáticas semelhantes a corpos de Lewy, e no aparecimento de distúrbios motores (hipocinesia e rigidez) em ratos, reproduzindo as características mais importantes da DP em humanos, vimos a necessidade de complementar estes estudos com experimentos *in vitro*, a fim de examinar possíveis mecanismos através dos quais a inibição do complexo I mitocondrial poderia causar ou potencializar a morte neuronal.

### 5.1. COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS

Diversos protocolos para obtenção de culturas primárias neuronais são hoje disponíveis na literatura científica, capazes de gerar, segundo seus autores, padrões diferentes em termos de composição de neurônios, células da glia e seus subtipos.

Nos protocolos utilizados neste trabalho, culturas mistas de mesencéfalo ventral mostraram-se constituídas de  $\cong 28\%$  de astrócitos,  $22\%$  de micróglia,  $16\%$  de neurônios

TH-positivos e 39% de neurônios MAP-2 positivos, enquanto que as culturas mistas derivadas de hipocampo apresentaram fenótipo com  $\cong$  15% de astrócitos, 10% de micróglia, 10% de neurônios TH-positivos e 36% de neurônios MAP-2 positivos (Figura 5).

Em estudo realizado por Gao *et al.* (2002), foi utilizado protocolo para obtenção de culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral, com a utilização de meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% HS, 10% FBS, 1 g/L de glicose, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100  $\mu$ M de aminoácidos não-essenciais, 50 U/ml de penicilina e 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina, mantidas em condições adequadas (37° C em atmosfera umidificada com 5 % CO<sub>2</sub>). Como resultado, os autores obtiveram a seguinte composição:  $\cong$  12 % OX-42, 48 % para GFAP, 40 % para Neu-N, específicos para marcação de microglia, astrócitos e neurônios, respectivamente. Do total de neurônios reativos para Neu-N, 2,8 a 3,8 % apresentaram-se também imunorreativos para o anticorpo anti-TH (tirosina-hidroxilase), específico para marcação de neurônios dopaminérgicos, após sete dias *in vitro*.

Em outro estudo feito por Kim *et al.* (2000), os autores desenvolveram protocolo para culturas mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo, de tecido cortical e de mesencéfalo a partir de ratos embrionários da linhagem Fischer 344 entre 16-17 dias. As culturas foram mantidas em MEM suplementado com 10 % HS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100  $\mu$ M de aminoácidos não-essenciais, 15 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina, 50 $\mu$ g/ml de estreptomicina e 50 $\mu$ g/ml de gentamicina. Estas culturas apresentaram no sétimo dia de cultura uma distribuição, no hipocampo, de 65 % de

neurônios e 5,8 % de microglia; culturas corticais apresentaram 60 % de neurônios e 2,8 % de microglia, enquanto que as culturas mesencefálicas apresentaram 42 % de neurônios e 20 % de microglia; o restante foi supostamente composto por astrócitos.

Em um trabalho mais recente, culturas mesencefálicas mistas neurônio/glia, mantidas em MEM suplementado com 10 % de FBS inativado por calor, 10 % de HS inativado por calor, 1 g/l de glicose, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100  $\mu$ M de aminoácidos não-essenciais, 50 U/ml de penicilina e 50  $\mu$ g/ml de estreptomicina, em ambiente adequado, apresentou padrão fenotípico com  $\cong$  48 % de astrócitos, 11 % de microglia e 40 % de neurônios, dos quais  $\cong$  1 % foram imunorreativos para o anticorpo anti-TH (Zhang *et al.*, 2005).

O protocolo desenvolvido e utilizado neste trabalho apresentou constituição de neurônios e gliócitos relativamente diferente da encontrada em outros estudos, a despeito de que também houve heterogeneidade entre os resultados anteriormente mencionados, o que demonstra grande variabilidade entre protocolos e seus resultados. Os protocolos também diferem bastante, especialmente no que se refere às condições de manutenção das culturas, o meio essencial utilizado para a proliferação celular (MEM, MEM suplementado, DMEM, NBA) e à densidade de plaqueamento, que podem, somadas, gerar discrepâncias menores aqui mencionadas.

Nosso estudo preservou, no entanto, algumas características esperadas em função de outros trabalhos citados na literatura. Nossos resultados mostram que as culturas mesencefálicas mistas apresentaram maior densidade de neurônios dopaminérgicos (ou reativos para TH) do que as culturas mistas derivadas de hipocampo, confirmando nossa

suspeita de que nesta região, por compreender a substância negra, que sabidamente possui elevada densidade de neurônios dopaminérgicos, teríamos maior densidade deste fenótipo neuronal. Adicionalmente, as culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram densidade de microgliócitos bem maior do que as culturas derivadas de hipocampo, também confirmando outros resultados (Hartmann *et al.*, 2003; Lawson *et al.*, 1990). Em função de que não realizamos a dissecação da substância negra a partir do mesencéfalo ventral, é bem provável que estejamos fazendo contagens que não representam a densidade de neurônios dopaminérgicos específica daquele núcleo mesencefálico, uma vez que são encontradas diversas outras populações de neurônios no mesencéfalo ventral com diferentes sistemas de neurotransmissores.

Para os nossos propósitos, portanto, estes experimentos nos permitem dizer que nas culturas de mesencéfalo ventral a densidade de células da glia, especialmente células da microglia, é superior à densidade encontrada em culturas de hipocampo, além de nos garantir que trabalhamos com uma população considerável de neurônios dopaminérgicos, validando a utilização deste paradigma como um modelo *in vitro* para o estudo da degeneração produzida na doença de Parkinson.



## 5.2. PADRONIZAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIS.

Semelhante a diversos estudos descritos na literatura, a exposição à rotenona mostrou um efeito dependente de concentração no modelo experimental *in vitro* utilizado neste trabalho, nas duas populações neuronais avaliadas (hipocampo e mesencéfalo).

Sob as condições de cultura testadas, ambas as populações neuronais apresentaram suscetibilidade para as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 nM, sem diferença estatística entre os efeitos produzidos para cada população.

Apesar de alguns estudos sugerirem que a rotenona promove degeneração dopaminérgica seletiva (Alam & Schmidt, 2004; Gao *et al.*, 2003; Betarbet *et al.*, 2000), esta ideia parece longe de constituir unanimidade, pois existem estudos que indicam que este composto promove degeneração não seletiva, afetando diversas populações neuronais em modelos experimentais tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lapoint *et al.*, 2004; Ferrante *et al.*, 1997). Nossos resultados parecem caminhar nesta mesma direção, ao observarmos intensa degeneração induzida por rotenona também no hipocampo, onde a população de neurônios dopaminérgicos não é majoritária. Tais resultados, no entanto, não invalidam o modelo utilizado neste trabalho, pois na própria doença de Parkinson o processo degenerativo não ocorre exclusivamente em neurônios dopaminérgicos, apesar do uso disseminado da expressão “degeneração específica da via nigroestriatal dopaminérgica” para caracterizar a perda neuronal observada nos pacientes. Assim, observa-se nestes pacientes degeneração bem mais extensa e difusa, comprometendo também outros sistemas de neurotransmissão em diversas regiões encefálicas, como por exemplo os sistemas de neurotransmissão noradrenérgico (*locus coeruleus*), serotoninérgico (núcleo da rafe) e

colinérgico (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do nervo vago), assim como no córtex cerebral (especialmente os córtices cingulado e entorrinal), bulbo olfatório e no sistema nervoso autônomo (Dauer & Przedborski, 2003).

Como já apresentado anteriormente, neurônios dopaminérgicos apresentam-se como células particularmente sensíveis a agressões, tais como o provocado aqui com a exposição à rotenona, que promove danos oxidativos como resultado de inibição do complexo I mitocondrial (Greenamyre *et al.*, 1999; Jenner, 2001).

Na composição deste maior grau de suscetibilidade desta população neuronal, temos a combinação com grande densidade de células reativas para o anticorpo OX-42, as células da microglia, que correspondem às células imunes residentes no encéfalo (Kreutzberg, 1996; Gonzalez-Scarano & Baltuch, 1999). Estes resultados confirmam o que já se encontra bem documentado na literatura, de que a região do mesencéfalo da qual faz parte a substância negra (SN) apresenta a mais elevada densidade de células da microglia no encéfalo (Lawson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000). Sob condições fisiológicas, estas células realizam a vigilância imune no tecido. A ativação destas tem sido associada com processos degenerativos através da produção de uma variedade de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, que incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), eicosanóides, óxido nítrico (NO) e ânion superóxido (Chao *et al.*, 1992; Cassarino *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000, 2001; McGuire *et al.*, 2001). Estas referências somadas apontam para a possibilidade de que a ativação microglial pode representar um evento inicial importante que contribui para a degeneração de neurônios dopaminérgicos da SN como consequência da exposição à rotenona, sob nossas condições experimentais.

Torna-se importante mencionar, no entanto, o que mais complica esta discussão, que alguns autores sugerem que a microglia possa exercer um papel protetor contra agentes exógenos através de uma resposta inflamatória (Gao *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 2005), principalmente em regiões com menor densidade destes tipos celulares.

Gao *et al.* (2002), utilizando ratos da linhagem Fischer 344, mostraram que a rotenona promove redução dependente de concentração tanto na captação de dopamina quanto no número de neurônios imunorreativos para a enzima tirosina hidroxilase em culturas mesencefálicas, mistas ou semipuras; neste caso, tal como observado alguns de nossos experimentos preliminares (dados não mostrados) com culturas primárias, as culturas semipuras de neurônios também mostraram menor suscetibilidade aos efeitos tóxicos da rotenona, apresentando redução na captação de dopamina estatisticamente significativa nas concentrações a partir de 25 nM; enquanto que em outro estudo as culturas mistas apresentaram tais efeitos nas concentrações a partir de 1 nM (Gao *et al.*, 2003b).

Em outro estudo, Sherer *et al.* (2003c), utilizando células de neuroblastoma humano da linhagem SK-N-MC, verificaram que a rotenona promoveu morte celular dependente de concentração, através do método fluorescente “Sytox green”, a partir da concentração de 10 nM, bem como redução na síntese de ATP e aumento na concentração de proteínas carboniladas. Resultados semelhantes foram obtidos com outra linhagem de células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, as quais apresentaram aumento na percentagem de células em estado apoptótico, bem como diminuição do número de células viáveis (Wang & Xu, 2005).

Em resumo, nossos resultados confirmam o efeito neurotóxico da rotenona em culturas primárias de neurônios do hipocampo e mesencéfalo ventral, sob nossas condições experimentais, além de sugerir que a maior suscetibilidade a estes efeitos se deve a maior presença de neurônios dopaminérgicos combinada com maior densidade de células da microglia.

### 5.3. EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À ROTENONA NA VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIIS DERIVADAS DE MESENCÉFALO VENTRAL.

Diversos trabalhos têm investigado o efeito do tempo de exposição a toxinas, em alguns modelos *in vitro* de doença de Parkinson.

No modelo utilizado por Gao *et al.* (2002), a rotenona mostrou efeito dependente de tempo na captação de dopamina marcada em todas as concentrações testadas, sendo mais proeminente nas concentrações de 20 e 25 nM. Estes autores verificaram o efeito do tempo na captação de dopamina em intervalos de dois dias, por um período máximo de oito dias, em concentrações que variaram de 1 a 25 nM.

Em outro estudo utilizando a linhagem de células de neuroblastoma SK-N-MC verificou-se que, na concentração de 5 nM de rotenona, considerada pelos autores como subletal, houve um efeito dependente de tempo refletido nos níveis aumentados de glutathiona e de proteínas carboniladas insolúveis, indicadores de aumento na suscetibilidade ao estresse oxidativo e danos às proteínas, após um período de três semanas de tratamento. O mesmo efeito não foi verificado com regime de tratamento de uma ou duas semanas.

Além disso, os níveis de proteínas carboniladas solúveis não aumentaram, mesmo após quatro semanas de tratamento (Sherer *et al.*, 2002b).

Neste trabalho, foram utilizadas culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral, a fim de se verificar se a rotenona apresenta algum efeito tóxico dependente de tempo. O protocolo de tratamento das culturas com rotenona revelou que culturas expostas por mais tempo e a maiores concentrações são mais suscetíveis, observando-se como uma tendência de diferença na viabilidade celular, apesar de não serem estatisticamente significativos os resultados entre todos os tempos de exposição, corroborando parcialmente os resultados descritos por outros autores.

#### 5.4. VIAS DEPENDENTES DE ÍONS $\text{Ca}^{2+}$ NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA.

Embora alvo de intensa investigação, os mecanismos celulares que levam à degeneração induzida por rotenona ainda não se encontram estabelecidos de maneira definitiva. Entre os diversos mecanismos considerados importantes no processo está a interferência na homeostase dos íons cálcio. A fim de investigar um possível envolvimento dos íons cálcio nos mecanismos de toxicidade induzida por rotenona, analisamos algumas vias celulares do cálcio utilizando drogas que interferem na homeostase deste íon, para analisar o papel destes íons no modelo de neurodegeneração utilizado neste projeto.

O  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para o crescimento celular, embora seus efeitos sejam muito diversificados. Estes íons afetam o ciclo celular em mais de uma via: (1) a depleção dos picos de  $\text{Ca}^{2+}$  mediados por  $\text{IP}_3$  promove paralisação do ciclo celular nas fases G0/G1 e S,

(2) há a necessidade de um pico de  $\text{Ca}^{2+}$  para se completar a meiose e iniciar a mitose. Entretanto, os mecanismos específicos desses efeitos ainda estão por serem esclarecidos; Adicionalmente, não apenas a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , como também os níveis intracelulares atingidos iniciam a expressão de fatores de transcrição distintos. Além disso, embora esse aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular afete a expressão gênica e promova a progressão do ciclo celular, ele pode também pode ativar processos de morte celular programada ou apoptose (Clapham, 1995).

Sabendo-se que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol também pode estar correlacionado com toxicidade celular (Sousa *et al.*, 2003), três drogas que agem alterando a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, a nifedipina, o EDTA e o benzamil, foram utilizadas em nossos experimentos para avaliar se o influxo deste íon tem alguma relação com a diminuição da viabilidade celular induzida por rotenona em nossos experimentos. De acordo com os resultados obtidos, nenhuma das três drogas testadas alterou o padrão de viabilidade celular das culturas expostas à rotenona; ainda, nas maiores concentrações testadas para o EDTA e para o benzamil, associadas à exposição à rotenona, os resultados mostraram redução ainda maior na viabilidade celular das culturas. Não pode ser descartado também o fato de que foram avaliadas apenas três concentrações destes compostos, o que pode estar sub-dimensionando o efeito desta importante fonte de íons  $\text{Ca}^{+2}$  no processo degenerativo induzido por rotenona.

Estes resultados estão de acordo com a maioria dos experimentos semelhantes realizados por outros grupos. Por exemplo, em um estudo conduzido por Sousa *et al.* (2003), verificou-se que tanto o aumento extracelular na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  quanto de rotenona promoveram aumento na produção de radicais livres de maneira dependente de

concentração, sendo que a administração de EGTA, um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, promoveu redução na produção de radicais livres. Além disso, este estudo demonstrou um efeito sinérgico entre o  $\text{Ca}^{2+}$  e a rotenona.

Em outro estudo feito por Wang & Xu (2005), utilizando células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y, através das técnicas de citometria de fluxo e espectrofluorometria, verificou-se que o tratamento com rotenona em concentrações micromolares por 24 e 48 horas promoveu aumento no número de células apoptóticas com redução no número de células viáveis de maneira dependente de dose e de tempo, com concomitante elevação na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Em adição, a administração de nifedipina reduziu parcialmente o influxo deste íon e a utilização de BAPTA, um quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, reduziu o índice de células apoptóticas. A utilização de nimodipina, um outro inibidor de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem semelhante à nifedipina, em concentrações micromolares, promoveu redução na morte celular induzida por NMDA em culturas de células granulares cerebelares expostas agudamente (Düzenli *et al.*, 2005). Entretanto, o tratamento crônico com rotenona não mostrou alteração nos níveis de ERO formadas; além disso, a exposição por menos de duas semanas à concentração de 5 nM de rotenona não alterou a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  nesta população de células (Sherer *et al.*, 2001).

Por outro lado, o retículo endoplasmático age como uma rede para proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$  e sequestra ativamente este íon para o espaço intraorganelar. As ATPases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (“bombas” de  $\text{Ca}^{2+}$ ) presentes na membrana da organela utilizam ATP para bombear o  $\text{Ca}^{2+}$  para dentro da organela, onde ele é conjugado a moléculas tamponantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como por exemplo a calsequestrina, sem função intracelular conhecida, mas que age como molécula de armazenamento dinâmico de alta afinidade e

capacidade de captar  $\text{Ca}^{2+}$ . Embora as ferramentas farmacológicas para o estudo das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  não existam em abundância, a tapsigargina é uma substância que inibe irreversivelmente as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma bastante específica. Esta substância tem sido amplamente utilizada para promover extensa depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (Clapham, 1995).

Os resultados aqui apresentados sugerem que a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  microsomal exerce influência na viabilidade celular nos quatro tipos de culturas testados. Os resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  é bastante importante para a manutenção da homeostase deste íon. Sob nossas condições experimentais, a tapsigargina potencializou os efeitos tóxicos da rotenona, provavelmente por promover aumento demasiado na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promovendo redução ainda maior da viabilidade celular nas duas concentrações utilizadas. De vez que evidências na literatura sugerem que o aumento prolongado da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol pode promover diversos danos celulares como, por exemplo, ativação de nucleases que clivam e degradam a cromatina da célula, bem como a ativação de vias de morte celular por apoptose (Wang & Xu, 2005), estes resultados reforçam fortemente a sugestão de efeitos deletérios resultantes de aumentos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Existem poucas referências na literatura que tenham tentado endereçar a mesma pergunta apresentada aqui. Em acordo com nossos resultados, em um destes estudos, realizado com culturas de células granulares cerebelares, a adição de dantroleno, um inibidor da liberação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, e supostamente uma droga que antagoniza os efeitos da tapsigargina, promoveu neuroproteção contra a excitotoxicidade mediada por NMDA (Düzenli *et al.*, 2005).



A mitocôndria, uma outra organela que pode participar da homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, pode acumular  $\text{Ca}^{2+}$  a níveis acima de 0,5 mM na matriz mitocondrial, em função do grande gradiente eletroquímico criado pela troca de prótons ( $\text{H}^+$ ). O uniporte mitocondrial tem afinidade menor que as bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e é, provavelmente, significante apenas quando o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ultrapassa a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ . Sob condições patológicas, a mitocôndria tem capacidade de absorver grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente através deste uniporte mitocondrial (Clapham, 1995). Quando esta capacidade é superada, ocorre colapso do potencial de membrana mitocondrial e o  $\text{Ca}^{2+}$  é liberado juntamente com moléculas de baixo peso molecular que funcionam como soluto criando um gradiente osmótico no espaço intermembranar e, dessa forma, causando ruptura da membrana externa. Este fenômeno, conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial, ocorre devido à abertura de um grande poro presente na membrana interna, o poro de transição da permeabilidade mitocondrial, sendo um mecanismo de liberação de citocromo *c* e outras proteínas pró-apoptóticas, como pró-caspases e fator indutor de apoptose (Nicholls, 2005; Saris & Carafoli, 2005).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o vermelho de rutênio exerceu de forma discreta influência na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral na concentração de 1  $\mu\text{M}$  quando administrado juntamente com rotenona. Em experimentos realizados na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , o vermelho de rutênio promoveu redução discreta na toxicidade causada pela rotenona, confirmado pela análise estatística e por resultados prévios de outros autores (Dessi *et al.*, 1995; Düzenli *et al.*, 2005; Tapia & Velasco, 1997). Esse efeito neuroprotetor pode ter ocorrido devido o

vermelho de rutênio ter inibido a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, reduzindo assim o risco de sobrecarga deste íon para o interior da organela nesta situação de insulto. Em nítido contraste, na concentração de 3  $\mu\text{M}$ , houve uma potencialização do efeito tóxico da rotenona com redução da viabilidade celular nos quatro tipos de culturas testados. A razão para isto, que corrobora outros resultados igualmente conflitantes na literatura (Dessi *et al.*, 1995; Düzenli *et al.*, 2005; Tapia & Velasco, 1997), pode ser devido ao caráter inespecífico deste bloqueador, que reconhecidamente pode também atuar sobre outros sítios de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$ , tais como canais  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, proteínas ligantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , transportadores de membrana, em função da utilização da concentração subtóxica.

Em um estudo feito por Dessi *et al.* (1995), verificou-se que a exposição de células granulares cerebelares ao glutamato aumentou dramaticamente a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico paralelamente com aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Estes aumentos na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foram seguidos por intensa morte celular; a administração de vermelho de rutênio diminuiu drasticamente tanto o acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela mitocôndria quanto a morte celular promovida neste modelo experimental. Além disso, Düzenli *et al.* (2005) verificaram que o vermelho de rutênio promoveu redução na morte celular induzida por NMDA, da mesma população de células, de maneira dependente de dose, analisada pela técnica do azul Trypan; em nítido contraste, a administração isolada de vermelho de rutênio promoveu morte celular.

Em contrapartida, Velasco *et al.* (1995), utilizando o método do MTT, verificaram que a administração de vermelho de rutênio mostrou toxicidade celular dependente de dose e de tempo em culturas primárias de neurônios do córtex e do cerebelo;

as culturas primárias de astrócitos mostraram elevada resistência à toxicidade deste composto.

#### 5.5. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE MOGNO *Swietenia macrophylla* SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA

Apesar de radicais livres serem produzidos fisiologicamente nas células sem alterar sua homeostase, o estresse oxidativo causado pela sua produção excessiva tem sido implicado em doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson (Surmeier *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2011). Por conta disso, acredita-se que compostos polifenólicos têm potencial como moléculas capazes de sequestrar radicais livres, e têm despertado interesse crescente nos últimos anos devido seu potencial protetor e potencial terapêutico em doenças degenerativas relacionadas ao estresse oxidativo (Bixby *et al.*, 2005; Havsteen, 2002).

O estudo a respeito de folhas de *S. macrophylla*, rico em polifenóis, pode levar a descoberta de novas fontes de agentes antioxidantes, inclusive promovendo incentivo à preservação destas espécies de plantas. Falah e colaboradores (2008), por exemplo, reportou potente atividade antioxidante relacionada à catequina e epicatequina isolada de casca de *S. macrophylla*.

Neste estudo, os resultados apresentados aqui mostraram que doses de 1 a 20 µg/mL de extrato de folhas de mogno não apresentaram alteração na viabilidade celular, analisada pelo método do MTT. Porém, em concentrações de 30 µg/mL, as culturas apresentaram redução na viabilidade celular após exposição ao extrato de mogno pelo período de sete dias. Além disso, apesar de utilizarmos uma concentração não tóxica (20 µg/mL) do extrato para os experimentos de exposição concomitante à rotenona, a

associação deste composto mostrou potencializar o efeito tóxico da rotenona, aumentando o percentual de morte celular analisado pelo método da liberação da LDH.

Estes resultados estão de acordo com alguns estudos presentes na literatura (Moldzio *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2007).

Chung e colaboradores (2007) verificaram que a exposição de células SH-SY5Y a concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$  de epigallocatequina 3-galato (EGCG) potencializaram a citotoxicidade induzida por rotenona para estas culturas. Em contraste, a exposição destas células apenas ao agente antioxidante mostrou que apenas a concentração de 50  $\mu\text{M}$  apresentou efeito tóxico sobre estas culturas testadas. Este estudo verificou também que a redução na viabilidade celular analisada pelos métodos de LDH e MTT foi acompanhada de estresse oxidativo, maior atividade de caspase-3 e morte celular por apoptose.

Em outro estudo, Moldzio e colaboradores (2010) verificaram que a exposição de culturas mesencefálicas e culturas organotípicas a concentrações de 0,1, 1 e 10  $\mu\text{M}$  a EGCG apresentaram efeitos divergentes; enquanto as culturas primárias mesencefálicas não apresentaram efeitos deletérios, as culturas organotípicas mostraram aumento na captação de iodeto de propídio e de diacetado de 4-amino-5-metilamino-2',7'-diclorofluoresceína (DAF-FM), indicadores de morte celular; já os resultados sobre a exposição concomitante de rotenona e de EGCG não apresentaram alteração em relação às fatias expostas apenas à rotenona; no mesmo trabalho, em contrapartida, o tratamento com o agente antioxidante reduziu significativamente a captação de iodeto de propídio e de DAF-FM.

Em contraste a estes trabalhos, Marcer e colaboradores (2005), utilizando culturas primárias mesencefálicas, verificaram que estas culturas mostraram-se sensíveis a insultos oxidativos após tratamento com toxinas variadas (rotenona, MPP+, peróxido de hidrogênio, 6-OHDA e 4-hidroxinonenal). A exposição concomitante destas culturas às toxinas e a flavonoides promoveu redução da toxicidade induzida por todos os agentes citados.

A realização de mais experimentos, sob diferentes condições de cultura, além da utilização de frações específicas do extrato aquoso, mais concentradas em compostos antioxidantes com efeito estabelecido em outras preparações, pode resultar em maior êxito na utilização destes compostos originados do mogno como possíveis agentes neuroprotetores em modelos experimentais.

#### 5.6. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EM CULTURAS PRIMÁRIAS MESENCEFÁLICAS EXPOSTAS À ROTENONA

Baseado no que se encontra em estudos presentes na literatura expostos no tópico anterior, analisamos a possibilidade de que o sinergismo apresentado com a exposição das culturas à rotenona e ao extrato de mogno estivesse relacionado à produção de radicais livres.

Utilizando culturas primárias derivadas de tecido mesencefálico, verificamos aumento acentuado nos níveis de nitrito no sobrenadante das culturas expostas a 40 nM de rotenona. Ainda, culturas organotípicas expostas à mesma concentração de rotenona mostraram padrão de resultado semelhante para a produção de nitrito, analisado pelo

método do reagente de Griess, durante todo período de exposição à rotenona (ver Figura 18). Nossos experimentos mostraram ainda que o tratamento de culturas organotípicas com rotenona e extrato de mogno resultou em níveis de nitrito menores do que no grupo exposto à rotenona apenas. Nossos resultados estão de acordo com alguns dados da literatura (Abdin & Sarhan, 2011; Moldzio *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2005).

Moldzio e colaboradores (2010), citados anteriormente, encontraram aumento na produção de íons superóxido em culturas expostas à rotenona. Ainda, estas culturas não mostraram redução nos níveis desses radicais livres após tratamento concomitante com EGCG, apesar de terem apresentado redução na captação de DAF-FM e de iodeto de propídio.

Em outro estudo, Abdin e Sarhan (2011) verificaram em um modelo *in vivo* de exposição à rotenona que ratos expostos ao composto neurotóxico apresentaram redução na atividade mitocondrial, níveis de glutatona reduzidos, associado a aumento nos níveis de nitrito e caspase-3, corroborando nossos resultados, que mostraram aumento nos níveis de nitrito após exposição *in vitro* ao agente neurotóxico, bem como aumento na atividade de caspase (ver tópico seguinte).

#### 5.7. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR NO MODELO *IN VITRO* DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR ROTENONA

Baseado em nossos resultados, verificamos que a exposição concomitante ao composto neurotóxico e ao extrato de mogno promoveu efeito sinérgico, exacerbando a morte celular e produção de nitrito, analisados pelos métodos do MTT, LDH e reagente de

Gries. Além disso, a análise da expressão de espectrina, caspase e calpaína pelo método de Western blot mostrou padrão de resultados semelhante aos resultados encontrados através da análise de viabilidade celular e produção de nitrito. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos realizados anteriormente (Abdin & Sarhan, 2011; Moldzio *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2007; Mercer *et al.*, 2005).

A exposição das culturas primárias à rotenona mostrou aumento nos níveis de expressão de espectrina e de caspase, sugerindo a ocorrência de indução de apoptose. A exposição ao extrato de mogno, por sua vez, promoveu aumento nas três proteínas estudadas; ainda, a exposição concomitante aos dois compostos mostrou efeito sinérgico, onde verificamos aumento acentuado na expressão de espectrina, caspase e calpaína, indicando que nossos paradigmas de tratamento se mostraram protetores contra a toxicidade induzida por rotenona e apresentaram, ainda, indução de morte celular tanto por necrose como por apoptose.

Outros trabalhos, sob diferentes condições de experimentação, já investigaram mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida por rotenona. Hartley *et al.* (1994), utilizando a linhagem de células de feocromocitoma humano PC12, através das técnicas de liberação de lactato desidrogenase e análise de fragmentação de DNA, verificaram que dois inibidores do complexo mitocondrial I, MPP<sup>+</sup> e rotenona, promoveram morte celular dependente de concentração concomitante com fragmentação do DNA, indicando que as células possivelmente estavam em processo de morte celular por apoptose; em contrapartida, doses muito elevadas dessas duas toxinas promoviam morte celular com fragmentação do DNA reduzida, indicando a ocorrência de morte celular por necrose. No mesmo trabalho, os autores verificaram que células da linhagem de neuroblastoma humano

SK-N-MC apresentaram os mesmos efeitos vistos em PC12; em contrapartida, células de carcinoma de pulmão humano da linhagem A549 mostraram maior resistência à indução de apoptose por estas toxinas, sem ocorrência de fragmentação do DNA. Tais resultados sugerem que, embora estas substâncias sejam potencialmente tóxicas, seus efeitos dependem, além da concentração utilizada, da suscetibilidade celular aos efeitos tóxicos de tais substâncias.



## 6. CONCLUSÕES

- A exposição das culturas à rotenona promoveu redução na viabilidade celular de maneira dependente de dose, em todas as concentrações testadas;
- As culturas derivadas de diferentes populações neuronais mostraram-se igualmente suscetíveis à toxicidade induzida por rotenona em todas as concentrações utilizadas;
- Não houve diferença acentuadamente significativa na viabilidade celular em culturas expostas a diferentes períodos de exposição, porém verificou-se tendência de redução mais evidente nas maiores concentrações e períodos mais longos;
- Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  parecem não desempenhar importante papel na degeneração induzida por rotenona nas vias testadas, a exceção do vermelho de rutênio que promoveu uma sutil reversão nos efeitos tóxicos da rotenona na concentração de  $1\mu\text{M}$ ;
- O extrato aquoso de folhas de mogno potencializou a toxicidade induzida por rotenona na concentração utilizada, bem como também induziu redução da viabilidade celular de culturas expostas apenas ao extrato;
- Verificou-se que culturas expostas à rotenona, com ou sem exposição concomitante ao extrato de mogno apresentaram indução de morte celular tanto por apoptose quanto por necrose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN, A.A., SARHAN, N.I. Intervention of mitochondrial dysfunction-oxidative stress-dependent apoptosis as a possible neuroprotective mechanism of  $\alpha$ -lipoic acid against rotenone-induced parkinsonism and L-dopa toxicity. **Neuroscience Research**. 71(4): 387-95, 2011.
- ALAM, M. & SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research** 136: 317-324, 2002.
- ALAM, M., SCHMIDT, W.J. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. **Behavioural Brain Research** 153: 439-446, 2004.
- BA, F., PANG, P.K.T., BENISHIN, C.G. Role of  $Ca^{2+}$  channel modulation in the neuroprotective actions of estrogen in  $\beta$ -amyloid protein and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) cytotoxic models. **Neurochemistry International** 45: 31-38, 2004.
- BEAL, M.F., Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience** 2: 325-332, 2001.
- BETARBET, R., SHERER, T.B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A.V., GREENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience** 3: 1301-1306, 2000.
- BIXBY, M., SPIELER, L., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sciences**. 77 (3): 345-58, 2005.

- BOKA, G., ANGLADE, P., WALLACH, D., JAVOY-AGID, F., AGID, Y., HIRSCH, E.C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** **82**: 615-624, 1994.
- BRONSTEIN, D.M., PEREZ-OTANO, I., SUN, V., MULLIS SAWIN, S.B., CHAN, J., WU, G.C., HUDSON, P.M., KONG, L.Y., HONG, J.S., MCMILLIAN, M.K. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. **Brain Research** **704**: 112-116, 1995.
- CALNE, D.B. The neuromythology of Parkinson's disease. **The Parkinsonism and Related Disorders** **10** (5): 319–322, 2004.
- CASSARINO, D.S., FALL, C.P., SWERDLOW, R.H., SMITH, T.S., HALVORSEN, E.M., MILLER, S.W., PARKS, J.P., PARKER, W.D. Jr., BENNETT, J.P. Jr. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta** **1362** (1): 77-86, 1997.
- CASTANO, A., HERRERA, A.J., CANO, J., MACHADO, A. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1-beta and IFN-gamma. **Journal of Neurochemistry** **81**: 150-157, 2002.
- CHUNG, W.-G., MIRANDA, C.L., MAIER, C.S. Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Brain Research**. 1176: 133–142, 2007.
- CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell** **80**: 259-268, 1995.
- COSTA, E.T., OLIVEIRA, D.S., MEYER, D.A., FERREIRA, V.M.M., SOTO, E.E., FRAUSTO, S., SAVAGE, D.D., BROWNING, M.D., VALENZUELA, C.F. Fetal

- alcohol exposure alters neurosteroid modulation of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. **The Journal of Biological Chemistry** **275**: 38268-38274, 2000.
- DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron** **39**: 889-909, 2003.
- DAY, B.J., PATEL, M., CAVALETTA, L., CHANG, L.Y., STAMLER, J.S. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxid syntase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **96**: 12760-12765, 1999.
- DESSI, F., BEN-ARI, Y., CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Ruthenium red protects against glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture. **Neuroscience Letters** **201**: 53-56, 1995.
- DÜZENLI, S., BAKURIDZE, K., GEPDIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. **Toxicology in vitro** **19**: 589-594, 2005.
- FEANY, M.B. & BENDER, W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature** **404**: 394-398, 2000.
- FERRANTE, R.J., SCHULZ, J.B., KOWALL, N.W., BEAL, M.F. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. **Brain Research** **753**: 157-162, 1997.
- FREI, B. & RICHTER, C. N-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. **FEBS Letters** **198**: 99-102, 1986.
- GAO, H.M., HONG, J.S., LIU, B. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolisaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's

- disease. **The Journal of Neuroscience** **23** (4): 1228-1236, 2003b.
- GAO, H.M., HONG, J.S., ZHANG, W., LIU, B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience** **22**: 782-790, 2002
- GAO, H.M., LIU, B., ZHANG, W., HONG, J.S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences** **24**: 395-401, 2003.
- GERLACH, M. & RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission** **103** (8-9): 987-1041, 1996.
- GIASSON, B.I., DUDA, J.E., MURRAY, I.V., CHEN, Q., SOUZA, J.M., HURTOG, H.I., ISCHIROPOULOS, H., TROJANOWSKI, J.K., LEE, V.M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science** **290**: 985-989, 2000.
- GONZALEZ-SCARANO, F. & BALTUCH, G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. **Annual review of neuroscience** **22**: 219-40, 1999.
- GREENAMYRE, J.T., MACKENZIE, G., PENG T.I., STEPHANS, S.E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochemical Society symposium** **66**: 85-97, 1999.
- HARTLEY, A., STONE, J.M. HERON, C., COOPER, J.M., SCHAPIRA, A.H.V. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** **63** (5): 1987-1990, 1994.
- HARTMANN, A., HUNOT, S., HIRSCH, E.C. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. **Experimental Neurology** **184**: 561-564, 2003.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids.

**Pharmacol. Ther.** 96 (2-3): 67-202, 2002.

HERRERA, A.J., CASTANO, A., VENERO, J.L., CANO, J., MACHADO, A. The single

intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. **Neurobiology of Disease** 7: 429-447, 2000.

HIRSCHHORN, I.D., HITTNER, D., GARDNER, E.L., CUBELLS, J., MAKMAN, M.H.

Evidence for a role of endogenous opioids in the nigrostriatal system: influence of naloxone and morphine on nigrostriatal dopaminergic supersensitivity. **Brain Research**, 270 (1): 109-17, 1983.

HÖGLINGER, G.U., FÉGER, J., PRIGENT, A., MICHEL, P.P., PARAIN, K., CHAMPY,

P., RUBERG, M., OERTEL, W.H., HIRSCH, E.C. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. **Journal of Neurochemistry** 84: 491-502, 2003.

JENNER, P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. **Trends in**

**neurosciences** 24 (5): 245-7, 2001.

KIM, W.G., MOHNEY, R.P., WILSON, B., JEOHN, G.H., LIU, B., HONG, J.S.. Regional

difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **Journal of Neuroscience** 20: 6309-6316, 2000.

KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y.,

MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y., SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature** 392: 605-608,

1998.

KITAMURA, Y., SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A., TANIGUCHI, T. The parkinsonian models: invertebrates to mammals. **The Japan Journal of Pharmacology** **84**: 237-243, 2000.

KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in neurosciences** **19** (8): 312-8, 1996.

LAI, J.C. & BLASS, J.P. Inhibition of brain glycolysis by aluminum. **Journal of Neurochemistry** **42**: 438-446, 1984.

LANGSTON, J.W. & BALLARD JR., P.A. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **The New England Journal of Medicine** **4**: 310, 1983.

LANGSTON, J.W., BALLARD JR., P.A., TETRUD, J.W., IRWIN, I. Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science** **219**: 979-980, 1983.

LANGSTON, J.W., FORNO, L.S., TETRUD, J., REEVES, A.G., KAPLAN, J.A., KARLUK, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Annals of Neurology** **46**: 598-605, 1999.

LANGSTON, J.W., LANGSTON, E.B., IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human – Clinical and experimental aspects. **Acta Neurologica Scandinavica** **70** (suppl 100): 49-54, 1984.

LAWSON, L.J., PERRY, V.W., GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience** **39** (1): 151-

170, 1990.

LE, W., ROWE, D., XIE, W., ORTIZ, I., HE, Y., APPEL, S.H. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an *in vitro* model relevant to Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience** **21**: 8447-8455, 2001.

LEE, H.J., SHIN, S.Y., CHOI, C., LEE, Y.H., LEE, S.J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. **Journal of Biology Chemical** **277**: 5411-5417, 2002.

LIU, B., DU, L., HONG, J.S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **293**: 607-617, 2000.

LIU, B., WANG, K., GAO, H.M., MANDAVILLI, B., WANG, J.Y., HONG, J.S. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. **Journal of Neurochemistry** **77**: 182-189, 2001.

MANNING-BOG, A.B., MCCORMACK, A.L., LI, J., UVERSKI, V.N., FINK, A.L., DI MONTE, D.A. The herbicide paraquat causes upregulation and aggregation of alpha-synuclein in mice. **Journal of Biology Chemical** **277**: 1641-1644, 2002.

MANNING-BOG, A.B., MCCORMACK, A.L., PURISAI, M.G., BOLIN, L.M., DI MONTE, D.A.  $\alpha$ -synuclein overexpression protects against paraquat-induced neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience** **23**: 3095-3099, 2003.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review of Neuroscience**, **26**: 81-104, 2003.



- MCCORMACK, A.L., THIRUCHELVAM, M., MANNING-BOG, A.B., THIFFAULT, C., LANGSTON, J.W., CORY-SLECHTA, D.A., DI MONTE, D.A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiology of Disease** **10**: 119-127, 2002.
- MERCER, L.D., KELLY, B.L., HORNE, M.K., BEART, P.M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochem. Pharmacol.** 69 (2): 339-45, 2005.
- MIGLIORE, L., COPPEDÈ, L. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutat. Res.** 674 (1-2): 73-84, 2009.
- MIRZA, B., HADBERG, H., THOMSEN, P., MOOS, T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience** **95** (2): 425-432, 2000.
- MOLDZIO, R., RADAD, K., KREWENKA, C., KRANNER, B., DUVIGNEAU, J.C., WANG, Y., RAUSCH, W.D. Effects of epigallocatechin gallate on rotenone-injured murine brain cultures. **Journal of Neural Transm.** 117: 5-12, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods** **65**: 55-63, 1983.
- NESTLER, E.J., HYMAN, S.E., MALENKA, R.C. **Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. International edition, 2001. p. 53-55.
- NICHOLLS, D.G. Mitochondria and calcium signaling. **Cell Calcium**, 2005.
- NICOTERA, P & ORRENIUS, S. The role of calcium in apoptosis. **Cell Calcium** **23**:

173–180, 1998.

NOBRE JR., H.V., CUNHA, G.M., MAIA, F.D., OLIVEIRA, R.A., MORAES, M.O., RAO, V.S. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** **136** (2): 175-80, 2003.

PARKER, W.D., JR., BOYSON, S.J., PARKS, J.K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Annals of Neurology** **26**: 719-723, 1989.

PERIER, C., BOVÉ, J., VILA, V., PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. **TRENDS in Neurociences** **26**: 345-346, 2003.

PLENZ, D., KITAI, S.T. Organotypic cortex-striatum-mesencephalon cultures: the nigrostriatal pathway. **Neuroscience Letters**. 209 (3): 177-80, 1996.

POLYMEROPOULOS, M.H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S.E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E.S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W.G., LAZZARINI, A.M., DUVOISIN, R.C., DI IORIO, G., GOLBE, L.I., NUSSBAUM, R.L. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science** **276**: 2045-2047, 1997.

SADRZADEH, S.M. & SAFFARI, Y. Iron and brain disorders. **American Journal of Clinical and Pathology** **121**: 64-70, 2004.

SAMII, A., NUTT, J.G., RANSON, B.R. Parkinson's disease. **The Lancet** **363**: 1783-1793, 2004.

- SARIS, N.E.L. & CARAFOLI, E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. **Biochemistry** **70** (2): 187-194.
- SAWADA, H., IBI, M., KIHARA, T., URUSHITANI, M., HONDA, K., NAKANISHI, M., AKAIKE, A., SHIMOHAMA, S. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. **FASEB Journal** **14**: 1202-1214, 2000.
- SAWADA, H., KAWAMURA, T., SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A., KIMURA, J. Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. **Journal of Neuroscience Research** **43**: 503-510, 1996.
- SAWADA, H., SHIMOHAMA, S., TAMURA, Y., KAWAMURA, T., AKAIKE, A., KIMURA, J. Methylphenylpyridium ion (MPP<sup>+</sup>) enhances glutamate-induced cytotoxicity against dopaminergic neurons in cultured rat mesencephalon. **Journal of Neuroscience Research** **43**: 55-62, 1996b.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. **The Neuroscientist** **8**: 192-197, 2002.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., KIM, J.H., GREENAMYRE, J.T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** **341**: 87-90, 2003.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., STOUT, A.K., LUND, S., BAPTISTA, M., PANOV, A.V., COOKSON, M.R., GREENAMYRE, J.T. An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered  $\alpha$ -synuclein metabolism and oxidative damage. **The Journal of Neuroscience** **22**: 7006-7015, 2002b.

- SHERER, T.B., BETARBET, R., TESTA, C.M., SEO, B.B., RICHARDSON, J.R., KIM, J.H., MILLER, G.W., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A., GREENAMYRE, J.T. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience** **23** (34): 10756–10764, 2003c.
- SHERER, T.B., KIM, J.H., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and  $\alpha$ -synuclein aggregation. **Experimental Neurology** **179**: 9-16, 2003b.
- SHERER, T.B., TRIMMER, P.A., BORLAND, K., PARKS, J.K., BENNETT JR., J.P., TUTTLE, J.B. Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Brain Research** **891**: 94-105, 2001.
- SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., KITAMURA, Y., TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **TRENDS in Molecular Medicine** **9**: 360-365, 2003.
- SHULMAN, L.M. Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease? **Parkinsonism and Related Disorders** **8**: 289-295, 2002.
- SMEYNE, M., SMEYNE, R.J. Method for culturing postnatal substantia nigra as an *in vitro* model of experimental Parkinson's disease. **Brain Research Protocols** **9**: 105-111, 2002.
- SOUSA, S.C., MACIEL, E.N., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. **FEBS Letters** **543**: 179-183, 2003.
- STAHL, W. & SIES, H. Reactive oxygen species. **Research Monographs. Institute for Biochemistry and Molecular Biology**, 2002.

- STREIT, W.J., CONDE, J.R., FENDRICK, S.E., FLANARY, B.E., MARIANI, C.L. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurological research** **27** (7): 685-91, 2005.
- SURMEIER, D.J., GUZMAN, J.N., SANCHEZ-PADILLA, J., SCHUMACKER, P.T. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience**. 198: 221-31, 2011.
- TANNER, C.M. Occupational and environmental causes of parkinsonism. **Occupational medicine** **7**: 503-513, 1992.
- TAPIA, R. & VELASCO, I. Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways. **Neurochemistry International** **30** (2): 137-147, 1997.
- UVERSKI, V.N., LI, J., FINK, A.L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. **FEBS Letters** **500**: 105-108, 2001.
- VELASCO, I., MORAN, J., TAPIA, R. Selective neurotoxicity of ruthenium red in primary cultures. **Neurochemical research** **20** (5): 599-604, 1995.
- WANG, X.J. & XU, J.X. Possible involvement of Ca<sup>2+</sup> signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters** **376**: 127-132, 2005.
- ZHANG, W., WANG, T., PEI, Z., MILLER, D.S., WU, X., BLOCK, M.L., WILSON, B., ZHANG, W., ZHOU, Y., HONG, J.S., ZHANG, J. Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates

microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **The FASEB Journal** **19**: 533-542, 2005.